

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

DE LYON

Année 1968 - N° 32

PREMIERE THESE

Identification du genre *Staphylococcus* au sein de la famille des *Micrococcaceæ*
par le moyen du procédé Auxotab et de l'analyse factorielle;
le problème du pouvoir pathogène

*(Travail du Laboratoire de la Division de Microbiologie
du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées)*

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté :

Aspects toxicologiques et pharmacologiques du L S D

(diéthylamide de l'acide lysergique)

THESES

présentées

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON

et soutenues publiquement le 11 Mars 1968

pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie d'Etat

par

Paul CHAMBON

Licencié-es-Sciences

Ex-Interne en pharmacie des Hôpitaux de Lyon

né le 19 Janvier 1939

à Lyon



FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1968 - N° 32

PREMIERE THESE

Identification du genre *Staphylococcus* au sein de la famille des *Micrococcaceæ*
par le moyen du procédé Auxotab et de l'analyse factorielle;
le problème du pouvoir pathogène

*(Travail du Laboratoire de la Division de Microbiologie
du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées)*

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté :

Aspects toxicologiques et pharmacologiques du L S D

(diéthylamide de l'acide lysergique)

THESES

présentées

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON

et soutenues publiquement le 11 Mars 1968

pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie d'Etat

par

Paul CHAMBON

Licencié-es-Sciences

Ex-Interne en pharmacie des Hôpitaux de Lyon

né le 19 Janvier 1939

à Lyon





FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen Honoraire : M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen : M. J.F. CIER

Assesseurs : M. M. LEVRAT - M. J. DORCHE

Conseiller Administratif : M. H. PRUVOST

Professeurs Honoraires

MM. TRILLAT - GARIN - GATE - GABRIELLE - SANTY - DUCLOS - GUILLEMINET -
HERMANN - ROCHET - POLLOSSON - ENSELME - WERTHEIMER - SARROUY -
BANSSILLON - DECHAUME - LACROIX

MM.

Professeurs

J. CIBERT	Clinique urologique
P. PONTUS	Physique biologique (détaché à Beyrouth)
M. CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
F. PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
R. FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
P. CROIZAT	Clinique médicale C
P. MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
L. REVOL	Pharmacie galénique
H. PIGEAUD	Clinique obstétricale
J. BOURRET	Médecine du Travail
M. LEVRAT	Clinique médicale A
R. SOHIER	Bactériologie - Virologie - Immunologie
G. NETIEN	Botanique et Cryptogamie
P. BERTRAND	Clinique chirurgicale C
A. BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
B. DREVON	Pharmacie chimique et Pharmacologie
L. ROCHE	Médecine légale et Déontologie
J. COUDERT	Parasitologie et Pathologie exotique
P. MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audiophonie
L. PAUFIQUE	Clinique Ophtalmologique
H. THIERS	Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie

MM.

J. BRUN	Clinique de Pneumophtisiologie
J. CREYSSEL	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique
M. DARGENT	Clinique carcinologique
M. BERGER (1)	Physique nucléaire appliquée à la Médecine
A. GUICHARD	Anatomie Pathologique
P. GIRARD	Clinique Neuro-Psychiatrique et d'Hygiène Mentale
M. GIRARD	Clinique Médicale D
M. LATARJET	Anatomie
R. PEYCELON	Clinique Chirurgicale B
A VACHON	Pathologie Médicale
P. GALY	Physio-Pathologie des Voies Respiratoires
J. PAPILLON	Radiologie
M. JEUNE	Clinique Médicale Infantile et Hygiène du 1er Age
A. GONIN	Thérapeutique
P. MONNET	Clinique Médicale Infantile B
J. CHATONNET	Physiologie B
P. GUINET	Clinique Endocrinologique
H. COLLET (1)	Chimie Générale et Pharmaceutique
A. TRILLAT	Clinique de Chirurgie Orthopédique
Ch. FREIDEL	Clinique Stomatologique
J. MARION	Clinique de Chirurgie et d'Orthopédie Infantiles
J. DORCHE	Matière Médicale et Législation Pharmaceutique
L. MANSUY	Neurochirurgie
L. REVOL (1)	Hématologie
J. LECUIRE (1)	Neurochirurgie
H. LIARAS (1)	Clinique chirurgicale propédeutique
L. PERROT	Chimie
J.F. CIER	Physiologie A
J. PERRIN	Thérapeutique Chirurgicale et Chirurgie Opératoire
P. GOINARD (1)	Clinique Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie expérimentale
P. MICHAUD	Clinique de Chirurgie Cardiaque
M. PONT (1)	Séméio. Médicale
J. TRAEGER	Clinique de néphrologie et maladies métaboliques
J. MATHIEU	Clinique Gynécologique
G. FAUCON	Biologie Médicale et Pharmacodynamie
A. BERTOYE	Clinique des Maladies Infectieuses
G. VIGNON	Hydrologie Thérapeutique, Climatologie et Ecologie Sociale
D. VINCENT	Biochimie appliquée
A. CIER	Pharmacodynamie
L. COLOBERT	Chimie Biologique et Médicale
P. MAGNIN	Physiologie et Pathologie obstétricales
J. THIVOLLET	Hygiène et Action Sanitaire et Sociale
M. PLAUCHU (1)	Séméiologie et Médecine générale
J. FRANCILLON	Séméiologie Chirurgicale
C. GIROD	Histologie et Embryologie
X	Pathologie chirurgicale
X	Pathologie générale et expérimentale

(1) Professeurs à titre personnel.

MM.

Professeurs sans chaire

E. ROMAN	Parasitologie
J. FEROLDI	Anatomie pathologique
R. MORET	Physique biologique
L. ODDOUX	Botanique et Cryptogamie
C. DESPIERRES	Médecine générale
J.P. GARIN	Parasitologie
F. TOLOT	Médecine du Travail
R. MALLEIN	Chimie analytique
E. PINET	Electro-Radiologie
D. COLOMB	Dermatologie
R. FRANCOIS	Pédiatrie
M. COLIN	Médecine Légale
F. LARBRE	Pédiatrie
J. GRAS	Chimie Biologique

MM.

Maîtres de Conférences Agrégés Titulaires

R. CREYSSEL	Chimie biologique
J. GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
J. DESCOTES	Chirurgie générale
M. JOUVET	Pathologie expérimentale
R. MORNEX	Médecine générale
J.O. PEYRIN	Physique biologique
M. TOMMASI	Anatomie pathologique
P. BUFFARD	Electro-Radiologie
E. LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
Fr.de MOURGUES	Stomatologie
H. NAUSSAC	Maladies infectieuses
J. REBOUILLAT	Chirurgie générale
G. ROMAGNY	Pédiatrie
J.P. DELAHAYE	Médecine générale
R. DELEUZE	Anesthésiologie
M. GIRAUD	Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique
A. MICHEL	Anesthésiologie
R. LAMBERT	Médecine générale
D. FRIES	Médecine générale
R. GILLY	Pédiatrie
J. ROBERT	Médecine générale
A. BOUCHET	Anatomie
M. BETHENOD	Pédiatrie
D. GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
J.C. KALB	Pneumo-phthisiologie
J. SOUSTELLE	Chirurgie générale
J.J. VIALA	Médecine générale
P. VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
J.A. BERTRAND	Chimie Biologique
G. MARET	Chirurgie générale

MM.

J. VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie
L.C. CHOLLAT	Electro-Radiologie
J. FLEURETTE	Bactériologie
R. FLANDROIS	Physiologie
P. MOREL	Hématologie
H. TERMET	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
A. FREDERICH	Pharmacologie
M. DAUDET	Chirurgie infantile
J. BRUNE	Médecine générale et Thérapeutique
R. LOMBARD-PLATET	Chirurgie générale
M. BOUVIER	Rhumatologie
F. FREYCON	Pédiatrie
C. LAPRAS	Neuro-chirurgie
M. PELLET	Physiologie
J. DUQUESNEL	Electro-radiologie
H. DEJOUR	Orthopédie et Traumatologie
G. MOULIN	Dermato-Vénérologie
M. PERRIN-FAYOLLE	Pneumo-phtisiologie
P. PALIARD	Médecine générale et Thérapeutique
A. MORGON	Oto-rhino-laryngologie
M. PAUPERT-RAVAULT	Ophthalmologie
J. MOTIN	Anesthésiologie
J. PASQUIER	Médecine générale et Thérapeutique
J.L. VAUZELLE	Anatomie pathologique
J.C. CZYBA	Histologie et Embryologie
M. CABANAC	Physiologie
R. TOURAINÉ	Pneumo-phtisiologie
A. BEL	Médecine générale et Thérapeutique
F. CHARVET	Gynécologie-Obstétrique
M. MAYER	Cancérologie
G. BRAILLON	Anatomie et Chirurgie générale
H. VILLIERS	Chirurgie générale
P. LOUISOT	Chimie biologique et Chimie des Explorations fonctionnelles
J. COURJON	Neuro-Psychiatrie
J. LAIR	Stomatologie
Mme A. PINET	Electro-radiologie

Maîtres de Conférences Agrégés Stagiaires

J. FAVRE-GILLY	Hématologie
G. RIFFAT	Hygiène
M. ROLLET	Pharmacie galénique
C. BIZOLLON	Physique

MM.

Agrégés en Exercice

A. NOTTER	Gynécologie obstétricale
M. DUMONT	Obstétrique
B. SCHOTT	Neuro-psychiatrie
M. DEVIC	Médecine générale
R. HUGONNIER	Ophtalmologie
G. ALLEGRE	Neuro-chirurgie
A. GARDE	Médecine générale
R. FAYSSÉ	Orthopédie
J. GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
A. PERRIN	Médecine générale
J. NORMAND	Médecine générale
A. MOUNIER-KUHN	Chirurgie générale
J.L. CHASSARD	Electro-radiologie
R. GARMIER	Obstétrique
P. DUMAS	Stomatologie
J. SCHNEPP	Orthopédie
G. NOEL	Médecine générale

Examineurs de la Thèse

Président : M. le Professeur L. COLOBERT

Assesseurs : MM. A. BADINAND
L. PERROT
A. BERTOYE
J. BUISSIÈRE

A mon Père

qui m'a engagé dans la voie des études pharmaceutiques;
les connaissances intellectuelles et pratiques dont il
m'a fait bénéficier n'ont pas de prix pour moi. Que ce
travail soit pour lui le témoignage de toute l'affection
et de la reconnaissance que je lui porte.

A ma Mère

dont la tendresse et le dévouement ont toujours été
infinis.

A mes Beaux-Parents

en reconnaissance de toute l'affection dont ils m'ont
entouré.

A ma Femme

qui m'a encouragé et secondé tout au long de cette
thèse.

A toute ma Famille.

A notre président de thèse

Monsieur le Professeur L. Colobert

Chaire de Chimie Biologique et Médicale

qui nous a inspiré le sujet de cette thèse et nous a prodigué ses conseils au cours de ce travail; qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre gratitude et de toute notre reconnaissance.

A. nos juges

Monsieur le Professeur A. Badinand

Chaire de Chimie Analytique Pharmaceutique

qui fut un de nos premiers maîtres; il a bien voulu accepter de juger ce travail. Nous lui exprimons nos respectueux remerciements.

Monsieur le Professeur L. Perrot

Chaire de Chimie

qui nous a fait bénéficier de son enseignement. Il a bien voulu faire partie de notre jury de thèse; qu'il nous soit permis de lui adresser l'expression de toute notre reconnaissance.

Monsieur le Professeur A. Bertoye

Chaire de Clinique des Maladies Infectieuses

qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être l'un de nos juges; qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos respectueux remerciements.

Monsieur le Médecin Commandant J. Buissière

qui a bien voulu nous faire participer à ses recherches et assurer la constante surveillance de notre travail. Qu'il nous soit permis de lui adresser l'expression de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Médecin Lieutenant-Colonel R. Fontanges
Chef de la Division de Microbiologie (CRSSA)

qui, par sa compréhension, nous a permis de
poursuivre et de terminer notre travail dans sa
division. Nous lui adressons nos respectueux
remerciements.

A Monsieur le Médecin Capitaine J. Peny

qui a participé à l'élaboration de cette thèse.
Pour son aide précieuse, qu'il nous soit permis
de lui adresser l'expression de notre profonde
gratitude.

A Mademoiselle le Docteur F.N. Guillermet
(Chef de Service à l'Institut Pasteur)

qui, en nous préparant un abondant souchier,
nous a permis d'effectuer ce travail; qu'elle
veuille bien trouver ici l'expression de tous
nos remerciements.

Pour leur compréhension et l'aide qu'ils nous ont apportée, nous
tenons à remercier spécialement :

Monsieur le Professeur P. Monnet
Chaire de Clinique Médicale Infantile B

Monsieur le Professeur L. Joubert
Chaire des Maladies contagieuses, Zoonoses,
Législation sanitaire (Ecole Nationale Vétéri-
naire de Lyon)

Monsieur le Professeur J. Oudar
Chaire de Pathologie générale, Microbiologie,
Immunologie (Ecole Nationale Vétérinaire de
Lyon)

Madame A. Moulin

Mademoiselle le Docteur S. Chassignol

Nos camarades Fourcard, Ochin et Sandoz.

INTRODUCTION

Bien avant que Pasteur ait reconnu le rôle pathogène joué par les cocci que l'on identifia plus tard sous le nom de Staphylococcus, on connaissait le caractère épidémique d'affections diverses en particulier de furonculoses comme celle de 1852 qui, comme le signale Hunt (88) "...éclata en même temps aux quatre coins du monde...".

Blair (21) estime que la première infection incriminable à Staphylococcus est décrite dans la Bible; ne faudrait-il pas en effet attribuer à une staphylococcie une partie des maux dont souffrait Job dans son adversité ? Depuis Pasteur, grâce aux nombreux travaux qui ont vu le jour, la question paraissait réglée et comme le disait Bigger (17) : "... il y a vingt ans, la plupart des bactériologistes croyaient que tout fait important, touchant les Staphylococcus était connu, et pourtant ces dernières années ont été fructueuses en découvertes récentes".

Pendant longtemps, on a cherché à séparer Staphylococcus de Micrococcus, mais la présence de souches intermédiaires rendaient ce partage difficile et seules les méthodes d'étude de la structure de la bactérie elle-même semblent amener une solution. Cette distinction présente un intérêt non seulement taxonomique, mais également pratique car il est important d'identifier Staphylococcus qui, lui seul, a un rôle pathogène.

En reprenant l'étude des Micrococcaceae, nous nous proposons un double but. D'une part nous rechercherons s'il est possible de retrouver facilement le genre Staphylococcus et l'espèce aureus tels qu'ils ont été décrits par d'autres auteurs, et d'autre part si le pouvoir pathogène est rattachable à quelques propriétés particulières de ces bactéries.

Dans une première partie, nous décrirons les moyens jusqu'ici employés pour reconnaître le genre Staphylococcus, puis l'espèce aureus. Pour cela nous reprendrons l'analyse des épreuves classiques qui peuvent se subdiviser en méthodes enzymatiques, sérologiques ou lysotypiques. Nous ajouterons à ces épreuves la recherche de production de lysozyme. Ensuite nous envisagerons les relations entre les résultats de ces épreuves et le pouvoir pathogène, puis nous étudierons une nouvelle méthode, basée sur la recherche des enzymes bactériens et déjà appliquée à l'étude des Bacillus. Enfin nous décrirons les principes de l'analyse factorielle, adoptée en vue d'une classification.

La deuxième partie comportera la description des épreuves choisies dans le cadre de l'application de la méthode Auxotab. Nous étudierons ainsi successivement un souchier de référence et des souches de provenance diverse; nous procéderons ensuite au traitement des résultats par l'analyse classique, puis à l'analyse factorielle à l'aide d'un ordinateur. Le calcul mathématique devra nous permettre de conclure si la séparation des genres Micrococcus et Staphylococcus ainsi que la création de l'espèce aureus sont justifiées et s'il est possible de rattacher un pouvoir pathogène à certaines souches en fonction de l'équipement enzymatique de ces dernières.

Première Partie

ETAT ACTUEL DE LA QUESTION

CHAPITRE I
HISTORIQUE DE LA CLASSIFICATION DES
MICROCOCCACEAE

Après une première période de découverte et de description de Staphylococcus qui s'étend de 1880 à 1948, de nombreux auteurs ont cherché à établir la distinction entre ce genre et Micrococcus dont les caractères morphologiques et enzymatiques sont parfois très voisins.

A - DE 1880 A 1948

C'est le 3 mai 1880 que Pasteur (139), à l'Académie des Sciences, décrivit, d'après l'observation d'un pus de furoncle "...un parasite microscopique en forme de grains sphériques, par groupe de deux, qui est la cause de l'inflammation locale et de la formation du pus qui en est la conséquence...". Ogston, en 1881, appela cette bactérie "Staphylococcus". Rosenbach isola, en 1884, Staphylococcus albus et Passet mit en évidence Staphylococcus citreus en 1885 (160). Le genre Staphylococcus fut reconnu en 1890 par Flugge. Mais par la suite Migula et Huckler confondirent dans un genre unique Staphylococcus et Micrococcus (160). Dans la classification de Prévot de 1948 (151), on distingue trois tribus dans la famille des Micrococcaceae. Dans la tribu des Staphylococceae, qui comprend des bactéries groupées en amas plans, on distingue le genre Gaffkya constitué de bactéries assemblées en tétrades et le genre

Staphylococcus constitué d'amas irrégulier. Dans la tribu des Micrococceae qui est composée de bactéries groupées en amas plans, on définit le genre Sarcina constitué de paquets réguliers cubiques et le genre Micrococcus constitué d'amas irréguliers. Quant à la troisième tribu, celle des Streptococceae, elle est la seule à ne pas avoir de catalase, ce qui la différencie des deux autres.

Par la suite si l'individualité des genre Gaffkya et Sarcina fut discutée, l'individualisation des genres Staphylococcus et Micrococcus fut généralement admise, si l'on fait toutefois abstraction des publications d'Abd-El-Malek (1) et de Shaw (112).

B - DE 1948 A NOS JOURS

Les recherches se rapportant aux Micrococccaceae s'orientèrent dans trois direction principales :

- 1° - Etudes sur les voies métaboliques préférentielles.
- 2° - Etude de la constitution chimique de la cellule bactérienne.
- 3° - Etude de la structure antigénique.

- 1° - Etude sur les voies métaboliques préférentielles.

Dans la classification des Micrococccaceae on accorda une grande importance au métabolisme des glucides. Avant d'aborder cette étude, il convient de définir ce que l'on entend d'une part, par le terme de fermentation et d'autre part, par celui de respiration ou d'oxydation.

La fermentation s'observe en anaérobiose. Dans le cas du glucose, la glycolyse par la voie d'Emden-Meyerhof n'aboutit qu'à

une dégradation partielle qui s'arrête au stade de l'acide pyruvique; l'hydrogène prélevé au glucose au cours de cette dégradation est transféré sur l'acide pyruvique et il se forme alors des corps tels que l'acide lactique ou l'éthanol.

La respiration ou oxydation s'observe en aérobiose. La glycolyse est alors totale. Elle peut se faire par la voie d'Emden-Meyerhof et par l'intermédiaire du cycle de Krebs, on obtient finalement du gaz carbonique et de l'eau. L'autre voie possible est celle de Werburg-Dickens ou voie oxydative des pentoses, qui conduit à la formation de gaz carbonique et de triose-phosphate. Ce dernier peut être transformé en acide pyruvique (on retombe alors dans le cas précédent) ou bien en s'unissant à une autre molécule de triose-phosphate sous l'action de l'aldolase, donnera une molécule de triose-phosphate qui sera dégradée à son tour.

Quant au terme de respiration anaérobie, il correspond au catabolisme des glucides en présence d'un accepteur d'électrons autre que l'oxygène, en particulier les nitrites. L'oxydation du glucose conduit également dans ce cas, à l'obtention de gaz carbonique et d'eau.

Constatant que certains membres des Micrococcaceae catabolisaient le glucose en anaérobiose contrairement à d'autres qui n'acidifiaient celui-ci qu'en présence d'oxygène, Evans décida de faire la distinction entre Micrococcus et Staphylococcus au moyen de cette épreuve (64). Breed, en 1948, adopta le même principe de classification, tout en conservant la valeur des caractères morphologiques (27). En 1953 Hugh et Leifson proposèrent le milieu d'identification suivant :

peptone	0,2 g
chlorure de sodium	0,5 g
phosphate dipotassique	0,03 g
agar	0,3 g
glucose	1,0 g
bleu de bromothymol	0,003 g
eau distillée	100 ml

le pH final devant être ajusté à 7,1 (87).

Ce milieu devait permettre la mise en évidence du catabolisme aérobie ou anaérobie des glucides, quand on prend la précaution, dans ce dernier cas, de sceller le tube à la paraffine. Mais comme le montra Cowan (48), l'anaérobiose était incomplète, du fait des traces d'oxygène dissous.

En 1955, Evans (65) décida de prendre le pH avec un pH-mètre au lieu de faire ses lectures avec un indicateur coloré, et adopta le milieu suivant :

trypticoase	1,0 g
extrait de levure	0,5 g
chlorure de sodium	0,5 g
phosphate dipotassique	0,1 g
glucose	1,0 g
eau distillée	100 ml

Staphylococcus qui catabolise le glucose en aérobie et en anaérobiose, est classé comme aéro/anaérobie alors que Micrococcus qui ne peut utiliser le glucose qu'en présence d'oxygène, est rangé dans les aérobies stricts. Toutefois, Evans ne définit pas le pH servant de limite entre les deux genres, du fait de l'existence de nombreuses souches intermédiaires, difficiles à classer.

En 1957, dans le Bergey's Manual, on trouve la définition suivante :

Les Micrococcaceae sont des bactéries aéro-anaérobies, qui se divisent en plusieurs genres. Les genres Micrococcus et Staphylococcus présentent des cellules groupées en amas irréguliers; le genre Micrococcus, aérobie, oxyde ou n'oxyde pas le glucose, tandis que le genre Staphylococcus aéro-anaérobie, fermente le glucose. Le genre Gaffkya est composé de bactéries disposées en tétrades ou en paquets de huit cellules; le genre Sarcina comprend les bactéries disposées en paquets réguliers, formant plus de huit cellules (28).

En 1962, Pohja considère que les Micrococcus ne catabolisent pas l'arabinose en anaérobiose, quoique poussant sur milieu hyperchloruré, ne sont pas des Staphylococcus (149).

Mossel, en 1962, proposa le milieu suivant :

trypticase	10 g
extrait de levure	1,5 g
chlorure de sodium	5 g
mannitol	10 g
agar	15 g
pourpre de bromocrésol	15 mg
eau distillée	1000 ml
le pH devant être ajusté à 7,1.	

Mais ce milieu était trop restrictif car de nombreux Staphylococcus ne catabolisent pas le mannitol en anaérobiose; aussi Mossel adopta-t-il en plus l'épreuve du glucose (123). Baird-Parker, en 1963, ayant travaillé sur 1250 souches, proposa une classification basée sur l'utilisation aérobie ou anaérobie du glucose (9). Il adopta le milieu suivant :

glucose	0,5 g
phosphate diacide d'ammonium	0,1 g
chlorure de potassium	0,02 g
sulfate de magnésium	0,02 g
extrait de levure	0,1 g
agar	0,2 g
pourpre de bromocrésol	0,004 g
eau distillée	100 ml

le pH devant être ajusté à 7,0.

L'anaérobiose est obtenue par chauffage du tube avant l'emploi et par mise en place d'une couche de paraffine pour ralentir la diffusion de l'oxygène. Il utilisa ce moyen pour séparer Staphylococcus de Micrococcus, bactéries dont il continua l'exploration au moyen de cinquante-sept caractères portant sur la morphologie et les capacités enzymatiques. Il put subdiviser le genre Staphylococcus en six sous-groupes et le genre Micrococcus en sept sous-groupes.

En 1964, Cowan et Steel (49) entreprirent la comparaison des différents milieux jusqu'alors utilisés. Sur 85 souches étudiées en anaérobiose,

50	donnèrent	une	réaction	positive	avec	le	milieu	de	Hugh	et	Leifson
35	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	Baird-Parker
35	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	la jarre anaérobie
49	donnèrent	un	pH	final	de	6	avec	le	milieu	d'Evans	
39	"	"	"	"	"	5,5	"	"	"	"	
34	"	"	"	"	"	5,0	"	"	"	"	

En anaérobiose, le milieu de Baird-Parker et celui d'Evans, à condition que dans ce dernier cas le pH soit égal ou inférieur à 5, donnent des résultats comparables à ceux obtenus en anaérobiose complète (jarre anaérobie).

En 1965, Baird-Parker (10) préconisa l'emploi d'un nouveau milieu, semi-liquide, dans lequel on trouve de la peptone qui remplace les sels du milieu de 1963.

peptone	1 g
extrait de levure	0,1 g
glucose	1,0 g
pourpre de bromocrésol	0,004 g
agar	0,2 g
eau distillée	100 ml
le pH devant être ajusté à 7,2	

Les conditions d'anaérobiose sont identique à celles qu'il avait précédemment préconisées. Le genre Micrococcus est défini par une absence totale de catabolisme du glucose en anaérobiose, après cinq jours d'incubation. A sa classification précédente, Baird-Parker a ajouté un huitième sous-groupe, comprenant Micrococcus roseus (voir tableau n° 1). Par suite le Sous-Comité de Taxonomie (Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci) de 1965, ainsi que Bragga, Evans et Pike (11) (26) (66) (42) adoptèrent ce milieu. Dans le genre Staphylococcus, les seules espèces définies sont aureus et epidermidis; dans le genre Micrococcus, on ne reconnaît que les espèces luteus et roseus.

2° - Etude de la constitution chimique de la cellule bactérienne

En 1955, Cummins et Harris (51), rompant avec la classification en cours, classèrent en trois groupes, les Staphylococcus et les Micrococcus, d'après la composition en acides aminés de ceux-ci.

Principaux caractères distinctifs de la classification
de Baird-Parker 1965

Groupe 1 : Staphylococcus

Sous-groupes	I	II	III	IV	V	VI
Glucose (anaérobie)	+	+	+	+	+	+
Glucose (aérobie)	+	+	+	+	+	+
Coagulase	+	-	-	-	-	-
Phosphatase	+	+	+	-	-	-
Mannitol (anaérobie)	+	-	-	-	-	-
Mannitol (aérobie)	+	-	-	-	-	+
Acétoïne	+	+	-	+	+	+
Lactose	+	+	V	-	+	V
Maltose	+	+	-	V	+	V

Groupe 2 : Micrococcus

Sous-groupes	1	2	3	4	5	6	7	8
Glucose (anaérobie)	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose (aérobie)	+	+	+	+	+	+	-	V
Phosphatase	-	-	-	-	-	+	-	-
Mannitol (aérobie)	-	-	+	+	+	+	-	-
Acétoïne	+	+	+	+	-	-	-	-
Lactose	-	+	V	+	+	+	-	-
Maltose	V	+	+	+	+	+	-	-
Arabinose	-	-	-	+	V	+	-	-

+ : positif

- : négatif

V : variable

Les Micrococcus des sous-groupes 7 et 8 se distinguent par leur coloration naturelle :

M. luteus est pigmenté en jaune

M. roseus est pigmenté en rose

TABEAU N° 1

En 1965, Baird-Parker (10) fit un essai analogue; il analysa les constituants cellulaires de ses 1250 souches, résultats qu'il reporta dans sa classification préalablement basée sur l'acidification du glucose.

A la suite des travaux de Gause, Silvestri et Hill entreprirent de comparer la teneur en DNA des différentes bactéries constituant la famille des Micrococcaceae (69) (173).

Appliquant la technique de Marmur et Doty (117), Silvestri et Hill déterminèrent le rapport quantitatif pondéral guanine + cytosine/DNA, rapport appelé plus couramment GC %. Ils trouvèrent pour le genre Staphylococcus un GC % compris entre 30,8 et 36,5, alors que, pour le genre Micrococcus, ce rapport s'élève à 72,8-75 %. Cette nouvelle méthode se répandit aussitôt très rapidement.

Bohacek, Kocur et Martinek (23) (107) obtinrent pour les Staphylococcus un GC % compris entre 30 et 40 et pour les Micrococcus le GC % va de 65,5 à 76. Auletta (8) définit le GC % moyen des Staphylococcus qui est de 32 et pour les Micrococcus, celui-ci est de 62. En comparant ce type de classement avec celui obtenu par l'épreuve de l'utilisation du glucose en anaérobiose, il les trouva en parfait accord. En 1966, Rosypal (162) proposa un classement basé uniquement sur le GC %; il obtint deux groupes que l'on peut subdiviser en sous-groupes : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.

Groupe des Micrococcus

Sous-groupes	1	-	Le GC est compris entre	70,8	et	73,3	%
"	"	2	-	"	"	"	67,5 et 69,5 %
"	"	3	-	"	"	"	66,3 et 67,0 %

GC % des Micrococcus étudiés par Bohacek (1967)

Noms	CCM N°	G C %
<u>Micrococcus luteus</u>	132	71.0
" "	840	71.0
" "	1674	71.5
" "	337	72.3
" "	169	73.3
" "	410	73.7
" "	149	74.6
" "	409	75.5
<u>Micrococcus roseus</u>	679	69.0
" "	837	69.7
" "	385	71.0
" "	560	71.0
" "	633	72.8
" "	168	49.3
" "	1405	49.3
<u>Micrococcus littoralis</u>	2226	65.0
<u>Micrococcus</u> <u>présumé</u>	740	58.6
" "	836	68.3
" "	2087	68.3
" "	825	69.5
<u>Micrococcus cerolyticus</u>	901	35.6
<u>Micrococcus denitrificans</u>	982	64.0
" "	1396	66.3
<u>Micrococcus halodenitrificans</u>	286	65.0
<u>Micrococcus radiodurans</u>	1700	69.0
" "	1701	65.3
<u>Micrococcus cryophilus</u>	900	41.3
<u>Micrococcus aquivivus</u>	316	51.2
<u>Micrococcus eucinetus</u>	2388	48.0
" "	2389	50.3

TABEAU N° 2

Groupe des Staphylococcus

Sous-groupes	5	-	Le GC	est de	36,4 %			
"	"	6	-	Le GC	est compris entre 33,3 et 34,2 %			
"	"	7	-	"	"	"	"	30,7 et 32,7 %

Le sous-groupe 4 a un GC de 54 %; il est intermédiaire et ne rentre dans aucun des deux groupes. Seuls les sous-groupes 1 (Micrococcus luteus et Micrococcus aureus) sont clairement définis.

Bohacek, Kocur et Martinec, confirment ces résultats; seuls Micrococcus roseus et luteus sont définis, et leur GC % doit être compris entre 65 % et 75 % (24). Pour un certain nombre de micrococcus, Bohacek donne les GC % (voir tableau N° 2). L'étude de ce tableau montre que certaines souches étaient mal classées : ainsi deux Micrococcus roseus (CCM 168 et CCM 1405) ont un GC % de 49,3 %. Ils sont d'origine marine, mais ils sortent des normes admissibles, aussi Bohacek les rejette-t-il du genre Micrococcus. Par ailleurs, Micrococcus oerolyticus (CCM 901), avec un GC % de 35,6 % est défini comme un Staphylococcus epidermidis, tandis que Micrococcus cryophilus, denitrificans, halodenitrificans, radiodurans (CCM 900, CCM 982, CCM 1396, CCM 286, CCM 1700, CCM 1701) se rapprochent des bactéries à Gram négatif. Quant aux souches de Micrococcus eucinetus et aquivivus (CCM 2388, CCM 2389, CCM 316) ce sont des Micrococcus à reporter dans le genre Planococcus.

Mortensen et Kocur ont classé en trois groupes un certain nombre de souches, en s'appuyant sur les épreuves classiques d'utilisation des glucides en anaérobiose, sur la mise en évidence des phosphatases, lipases, arginine-décarboxylase, ... et sur leur CG % (122). Ils ont ainsi défini les trois groupes A, B, C :

Le groupe A, dit des "Staphylococcus", est défini par un GC% de 31,2 à 36,5 %. Ces bactéries sont des aéro-anaérobies facultatives, qui acidifient le glucose en anaérobiose, donnant un pH inférieur à 5. L'épreuve de l'arginine-décarboxylase est positive (voir Tableau N° 8, page 113).

Le groupe C comprend les "Micrococcus", définis par leur GC% de 68,3 à 75 %. Ils sont aérobies stricts. En anaérobiose, ils donnent avec le glucose un pH supérieur à 6,7 et l'épreuve à l'arginine-décarboxylase est négative.

Le groupe B est intermédiaire : la valeur du GC% est comprise entre 30,2 et 69,5 %. Le pH d'acidification du glucose est compris entre 5,3 et 6,8. L'épreuve de l'arginine-décarboxylase est positive si elle est effectuée en présence de sels minéraux, mais dans les conditions habituelles, en milieu peptoné, elle est négative.

La section A peut elle-même se subdiviser en groupes 1 et 2.

Les souches du groupe A 1 ont une coagulase, des phosphatases, une réaction positive à l'acétoïne et leur GC% est légèrement inférieur au groupe suivant.

Les souches du groupes A 2 donnent des réactions négatives avec les épreuves précédentes.

La section B se subdivise en deux groupes 3 et 4.

Les souches du groupe B 3 donnent une acidification avec le galactose, le lactose et le maltose. L'épreuve de l'acétoïne est positive.

Les souches du groupe B 4 ne donnent pas les réactions précédentes, mais elles sont capables de réduire les nitrates.

3° - Structure antigénique

La séparation entre Staphylococcus et Micrococcus est mal délimitée. Ces derniers possèdent quelques antigènes, peu connus, caractéristiques ni de genre ni d'espèce. Par contre Staphylococcus réagit beaucoup mieux, il possède deux antigènes, de nature polysaccharidique A et B; il peut donner des réactions croisées avec le genre Micrococcus, mais à des titres peu élevés (134).

On voit que, quelles que soient les méthodes chimiques, enzymatiques ou sérologiques utilisées, on peut reconnaître certains Staphylococcus et Micrococcus; à la limite de séparation des deux groupes, le choix est difficile et il faut admettre la création d'un groupe intermédiaire, rassemblant des souches mal définies, comme l'ont déjà proposé plusieurs auteurs.

CHAPITRE II

DEFINITION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

ET DE SON POUVOIR PATHOGENE

La pigmentation a été le premier critère de différenciation des Staphylococcus. Ainsi, on a défini l'espèce aureus par sa couleur jaune-orangée, puis d'autres espèces, citreus, albus ont également été désignées dans les mêmes conditions. Seulement par la suite, on s'est aperçu que la pigmentogénèse n'était pas un caractère stable car il est possible de passer d'un pigment doré à un pigment blanc et réciproquement. Ce phénomène s'observe in vitro au cours de repiquages et également in vivo. C'est pourquoi actuellement la pigmentation de Staphylococcus n'a plus qu'une importance secondaire (205).

Ce n'est que vers 1917 que l'espèce "aureus" a été reconnue, grâce au Comité de la Santé Américaine de Bactériologie (12). Prévot la définit par ses caractères morphologiques (151) et Shaw, en 1951, la décrit de la manière suivante : coccus à gram positif, aéro-anaérobie, possédant une catalase, une coagulase, une uréase, utilisant le glucose en anaérobiose, produisant de l'acétoïne, réduisant le bleu de méthylène et les nitrates (170). Mossel, en 1962, appelle "aureus" les bactéries qui possèdent une coagulase et qui utilisent le glucose en anaérobiose (123).

En 1965, on ne reconnaît que deux espèces : Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis, que l'on sépare au moyen des épreuves de la coagulase et de l'utilisation du mannitol en anaérobiose (49) (66) (26). Mais, en l'absence de coagulase, on peut appeler

"aureus" une souche qui utiliserait le mannitol en anaérobiose et qui posséderait une activité phosphatasique très marquée.

En 1966, Rosypal pensait pouvoir définir l'espèce "aureus" par un GC % compris entre 30,7 % et 32,7 % (162), mais Mortensen et Kocur (122) ne partagent pas cette opinion, car la limite entre les deux espèces de Staphylococcus est trop peu distincte.

La sérologie ne donne pas de meilleurs résultats, car il existe de nombreuses réactions croisées entre Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis (135).

Les seules méthodes ayant un intérêt taxonomique restent donc l'épreuve de la coagulase, l'utilisation du mannitol en anaérobiose, et la présence de phosphatases actives.

Il reste à savoir si ces mêmes épreuves donneront des renseignements sur le pouvoir pathogène de ces bactéries. Bien que, dans la pratique courante, les termes Staphylococcus aureus et Staphylococcus pathogène, s'emploient indifféremment l'un à la place de l'autre, il est intéressant de voir dans quelle mesure ces deux qualificatifs sont synonymes.

A - LES EPREUVES LES PLUS SIGNIFICATIVES

1° - Fermentation des glucides

Très rapidement les caractéristiques du métabolisme des glucides ont été la clé de voûte de la classification des Staphylococcus et des Micrococcus. Parmi les nombreux glucides étudiés, deux d'entre eux ont retenu particulièrement l'attention des bactériologistes, le glucose et le mannitol.

En 1953, Hugh et Leifson (87) ont proposé un milieu permettant de différencier la voie aérobie ou anaérobie du catabolisme du glucose. Dans un tube scellé contenant un milieu nutritif, un glucide, un indicateur de pH et les bactéries comme sources d'enzymes, la fermentation se manifeste par le virage de l'indicateur sur toute la hauteur du tube. Dans un tube identique, mais non scellé, une oxydation complète provoque le virage de l'indicateur en surface; on peut toutefois observer, même dans ce cas, une fermentation, en anaérobiose relative, dans la profondeur du tube. Hugh et Leifson montrèrent que le taux d'acide obtenu à partir du glucose, était supérieur dans le cas de l'anaérobiose; ils insistèrent donc pour que l'épreuve des glucides se fit dans un milieu riche en glucose et appauvri en peptones, un excès de peptones amenant la formation d'ammoniaque et d'amines qui pourraient masquer le faible taux d'acide produit au cours d'un lent catabolisme en aérobie.

Le milieu, très classique de Chapman (37) ne permet pas de distinguer entre les différentes voies métaboliques utilisées; il donne un aperçu global de la réaction. Il est utile de surveiller le virage de l'indicateur, pendant quarante-huit heures, si l'on ne veut pas manquer la mise en évidence d'une faible réaction d'oxydation (119). Dans le milieu de Hugh et Leifson, il faut attendre sept jours avant d'admettre que l'utilisation du glucose en aérobie n'est pas possible. Dans le cas des autres glucides, Hugh et Leifson ont

constaté que les bactéries qui ne catabolisaient pas le glucose en aérobiose ne pouvaient pas, dans des conditions d'anaérobiose, cataboliser d'autres glucides; c'est pourquoi, Baird-Parker (9), dans sa classification définit Micrococcus comme "ne fermentant aucun glucides".

Le métabolisme du mannitol rejoint celui du glucose, car après transformation en fructose-1-phosphate, il donne le fructose-6-phosphate, étape commune aux deux glucides (127) (128). L'absence de fermentation du mannitol peut être due à un défaut en mannitol-kinase ou en mannitol-1-phosphatédéshydrogénase. Il faut encore tenir compte du fait que pour certaines souches, les enzymes permettant l'utilisation du mannitol sont de type adaptatif (181) (182). Pour Pulverer (152) et Krynski (110), l'épreuve du mannitol est un bon critère de pathogénicité, car 95 à 99 % des Staphylococcus, pourvus de coagulase, fermentent ce glucide, mais d'autres auteurs obtiennent des résultats moins élevés (109) (110) (123). Quant aux souches sans coagulase, 35 % d'entre elles fermenteraient le mannitol; toutefois on note une acidification moins intense dans ce cas (79).

D'autres glucides ont été étudiés par Baird-Parker, mais seule la voie de l'oxydation directe a été envisagée; les données ainsi obtenues n'apportent pas d'informations nouvelles sur la pathogénicité de Staphylococcus. L'utilisation du mannitol en anaérobiose reste donc la seule épreuve utilisée pour caractériser le pouvoir pathogène, mais comme nous l'avons vu, il ne recueille pas l'unanimité.

2° - Recherche de la coagulase

Parmi toutes les autres épreuves enzymatiques, la recherche de la coagulase occupe une place privilégiée. En reconstituant le mécanisme in vitro avec un substrat biologique d'origine humaine ou animale comme le plasma, on pensait reproduire une des réactions qui se déclanchent localement dans l'organisme lors des infections staphylococciques. C'est à Delezenne (55), qu'il faut sans doute attribuer d'avoir découvert le premier en 1898, la propriété, de la part de Staphylococcus de coaguler le plasma oxalaté, et par la suite, Loeb et Much (112) (124) devaient confirmer ces travaux. Actuellement, le principe de la réaction n'a guère changé, bien qu'il existe près de quarante-cinq variantes, comme on a pu les dénombrer (184) (185).

Suivant son origine, la coagulase se divise en deux types. Dans le premier cas, elle n'est mise en évidence que dans les broyats de bactéries. On ne peut la détecter dans le milieu de culture; on dit que la coagulase est liée ou associée. Par opposition, l'autre type de coagulase est dit libre; il est diffusible et peut être extrait à partir du filtrat du milieu de culture (92) (165). Généralement et pour des raisons de commodité, c'est celui-ci que l'on met en évidence et cette épreuve a été préconisée par le dernier Comité International de Microbiologie (7).

Parmi les substrats utilisés, et bien que le plasma humain offre l'avantage de se rapprocher des conditions naturelles observées dans le cadre des infections, le plasma animal est plus facile à obtenir; aussi a-t-on choisi le Lapin comme donneur. Avant tout essai, quelques précautions sont recommandées, telles que de s'assurer que le plasma n'est pas trop fibrinolytique ni trop fibrinolytique, ou encore qu'il ne contienne pas d'anticorps anticoagulase (184). Un substrat, le tosyl arginine-méthyl-ester (TAME), a été récemment utilisé par Tager (185). Il permet d'obtenir des résultats quantitatifs et en même temps de préciser la spécificité d'action de la coagulase.

En effet la coagulase initialement inactive, nécessite une fraction plasmatique dite "coagulase reacting factor" (CRF) qui intervient au niveau de la transformation du fibrinogène en fibrine (174) (175) (18). Le CRF se rapproche donc de la thrombine, car ces deux corps agissent identiquement sur le TAME, en présence de coagulase. Bien qu'utilisant un substrat synthétique, la réaction nécessite du plasma; celui-ci ne joue plus le rôle de substrat, mais celui d'activateur de la coagulase.

La recherche de la coagulase peut se pratiquer de plusieurs façons, en choisissant la méthode sur boîte de Pétri, en tubes ou sur lames (35) (120). Cette dernière technique donne une réponse rapide (en moins d'une minute) tout en mettant en oeuvre un matériel simple; une goutte de plasma ajoutée à une goutte de suspension bactérienne; l'inconvénient majeur est, ici, une perte de sensibilité, car 10 % des souches "coagulase faible" échappent à cette recherche (174). Quel que soit le type de méthode envisagé, la cinétique de la coagulation devra toujours être suivie, afin d'éviter la redissolution du caillot par la fibrinolysine ou d'autres enzymes protéolytiques (174).

Depuis 1965, il existe une technique normalisée recommandée qui préconise la recherche de la coagulase libre, avec le plasma frais de Lapin. L'épreuve est dite positive si une coagulation, même minime est constatée en moins de vingt-quatre heures (7).

Jusqu'à ces dernières années, l'habitude était prise de diviser Staphylococcus en deux groupes, celui des pathogènes, possédant une coagulase et celui des non-pathogènes qui en étaient dépourvus. Si, théoriquement, ce type de classification est commode, il souffre néanmoins de nombreuses exceptions. Ainsi, par exemple, Tager (184) reconnaît avoir isolé presque autant de souches "coagulase positive", chez des porteurs sains, que de souches dépourvues de coagulase, chez des malades atteints d'endocardites. Ces constatations se retrouvent chez d'autres auteurs, comme Jeljaszewicz (96)

qui aboutit à la même conclusion, en se basant sur des prélèvements d'origine nasale; chez l'animal, on rencontre des anomalies identiques (74) (115).

On a montré récemment que la capacité de synthèse de la coagulase était un caractère pouvant disparaître facilement au cours des repiquages. Cette remarque devrait inciter à réfléchir sur le terme de "pathogénicité", conféré par l'épreuve de la coagulase. La classification des Staphylococcus a déjà tenu compte de ces modifications et la dénomination aureus n'exige plus, comme condition obligatoire, la positivité de cette épreuve.

3° - Recherche des Phosphatases

La recherche et le dosage des phosphatases ne commencèrent à être pratiquées d'une façon systématique qu'en 1943, date à laquelle King (105) utilisa le premier, le sel sodique du phosphate de phénolphthaléine, substrat qui, par sa simplicité d'emploi et de révélation, connut une très grande diffusion dans l'étude de l'équiment enzymatique. Le principe de la réaction est le suivant : on met à incuber l'ester phosphorique avec la souche à étudier, en présence ou non de tampon à un pH déterminé, à 37 ° C, pendant une durée variable. La lecture de fin de réaction se fait en ajoutant une base qui développe une coloration rouge, d'intensité proportionnelle à la quantité de phénolphthaléine libérée par les phosphatases.

Plusieurs modes opératoires ont été adoptés suivant les auteurs. Cannon (36) choisit un pH de 5,6 à 5,9, en présence d'un tampon acide acétique-acétate de sodium. Après 18 heures d'incubation, la lecture se fait dans un tampon carbonate-bicarbonate, à pH 11.

Vogelsang (191), Baird-Parker (9), Jacob et Willis (93), ont repris cette technique, alors que Szérémi (183) adoptait un milieu nutritif de gélose et de peptone. Quant à Borst-Pauwels (25), il opère à pH = 4,2, tandis que la révélation se fait à pH = 10,8, avec le tampon borate de sodium-soude.

Le temps d'incubation est extrêmement variable d'un auteur à l'autre; de 30 minutes avec Innis (89), il passe à 18 heures avec Cannon (36), et à 21 heures avec Kedzia (104).

Perez-Miravete (142) et Dlabac (58) attirent l'attention sur le fait que les souches utilisées doivent être fraîchement prélevées et repiquées, sinon elles perdent leurs propriétés phosphatasiques. Mais pour Kedzia (104) ces recommandations sont inutiles car, en reprenant des souches vieilles de trois, il ne constata aucun changement. Il est toutefois conseillé de les repiquer avant l'emploi.

Parmi les autres substrats proposés, le para nitrophenyl-phosphate possède l'avantage d'être spontanément chromogène, après hydrolyse (15) (113); au fur et à mesure de sa libération, le para nitrophénol développe une coloration jaune, dont l'intensité peut permettre d'apprécier la teneur en enzyme mise en jeu; de plus, Lovel (113) trouve que la sensibilité est supérieure à celle de l'ester de la phénolphtaléine. Le pH choisi est variable suivant les auteurs : il va de pH = 7,2 dans un tampon trihydroxyaminométhane (TRIS) à pH = 9,5 dans le glycocolle (85) (89). La coloration du para nitrophénol libéré peut être intensifiée avec de la soude ajoutée de façon à atteindre un pH optimum de 12.

Un troisième substrat a été proposé par Marinelli (116), c'est le sel sodique de l'ester phosphorique du phénol; on utilise le 2-6-dibromoquinone chlorimide pour caractériser le phénol libéré.

Barber et Kuper (13), en 1951, sont les premiers à introduire l'épreuve des phosphatases dans un essai de classification de Staphylococcus. Comparant cette épreuve avec celle de la coagulase, ils constatent une parfaite similitude : seules les souches "coagulase positive" possèdent des phosphatases. Quelques années plus tard Perez-Miravete (142) fera une observation analogue, en admettant une concordance de 98 % entre les deux épreuves.

Or récemment tous ces travaux ont été repris, des erreurs ont été mises à jour et la plupart de celles-ci sont dues à de mauvaises interprétations. Pendant longtemps les auteurs se sont attachés à la simple mise en évidence qualitative, et appréciaient l'intensité de la réaction de façon très subjective. En l'absence de données quantitatives, il est très difficile de déterminer le seuil de la positivité ou de la négativité d'une épreuve. De plus, on s'est aperçu que pratiquement toutes les souches de Staphylococcus avaient des activités phosphatasiques et qu'elles ne différaient que par leur intensité enzymatique (137). Pan (138) publie des résultats allant du

simple au quintuple, suivant qu'il s'agit de souches "coagulase positive" ou "négative".

Krynski et Kedzia (109) (110) ont également publié des travaux dans le même sens, en s'attachant surtout à la provenance des souches. Voici quelques chiffres avancés par ces auteurs, donnant ainsi un aperçu de l'activité phosphatasique des Staphylococcus, en fonction de leur origine.

Origine	mg de para nitrophénol libéré par mg de bactéries, calculé en azote
Septicémie	2,2 mg
Abcès	1,6 mg
Porteurs sains	1,0 mg

Les Staphylococcus, sans coagulase, ont fait l'objet d'études approfondies; le pourcentage de souches "phosphatase positive" varie de 25 à 80 % suivant les auteurs (93) (191), car les conditions de l'épreuve sont mal normalisées, fait regrettable, car dans des consitions précises, les résultats sont très reproductibles (118).

Des données précédentes, on peut dégager plusiques conclusions. Au risque d'y joindre quelques Staphylococcus epidermidis, il est possible de distinguer Staphylococcus aureus du groupe des Micrococcus, qui ne manifestent qu'une activité phosphatasique très faible ou nulle.

Angyal reconnaît à cette épreuve une valeur supérieure à celle de la coagulase; si un Staphylococcus n'a pas de coagulase, la présence d'une phosphatase très active, couplée à celle de la hyaluronidase suffit à le classer dans l'espèce aureus (5). Bien que dans la pratique, l'épreuve des phosphatases ne soit pas encore systématique, on peut considérer qu'elle a acquis, au cours de ces dernières années, une position de force, en concurrençant l'épreuve de la coagulase.

L'épreuve des phosphatases est d'un grand intérêt en ce qui concerne la classification des Staphylococcus; elle est en corrélation étroite avec le pouvoir pathogène, mais on ne doit pas la considérer comme absolue, car elle ne permet pas, à elle seule, de distinguer Staphylococcus aureus de Staphylococcus epidermidis.

4° - Recherche des lipases

La mise en évidence du pouvoir lipasique des staphylocoques remonte à 1952, date à laquelle Gillepsie et Alder (70) signalèrent l'opacification d'un milieu à base de jaune d'oeuf. Avec un substrat aussi complexe, il était assez difficile d'interpréter le mécanisme de la réaction et par conséquent de découvrir quel type d'enzyme entraînait en jeu.

Un premier essai de rationalisation voyait jour avec la mise en oeuvre de corps tels que la graisse neutre, l'huile de maïs, la tributyrine avec le Bleu de Nil comme réactif révélateur. Toutefois la réaction nécessitait encore un milieu gélosé comprenant des peptones, du glucose et des sels minéraux (119).

Sierra, en 1957, proposa une méthode simple, avec les Tweens comme substrats; il appliquait aux bactéries une technique que Gomori avait déjà employée pour la détection des lipases tissulaires (172) (73).

Les tweens utilisés comme substrats sont :

- | | | | |
|---------------|--------------------|--------------|--------------|
| - le tween 20 | ou polyoxyéthylène | mono-laurate | de sorbitan |
| - le tween 40 | " | " | -palmitate " |
| - le tween 60 | " | " | -stéarate " |
| - le tween 80 | " | " | -oléate " |

En mettant à incuber à 30 ou à 37° C le substrat et la suspension bactérienne, l'hydrolyse libère des acides gras qui, en présence de chlorure de calcium, précipitent sous formes de savons de chaux insolubles.

Actuellement, il existe de nombreux substrats synthétiques des lipases, dont voici les plus courants :

- l'Emullat O6 ou oléate d'hexaéthylène-glycol
- l'Emullat R 40 ou ester P.E.G. d'un glycéride de l'acide ricinoléique

- le Belsam III ou stérate d'hexaéthylène-glycol (56).
- l'ester monoacétique du glycérol
- les esters diacétiques du glycérol
- les esters triacétiques du glycérol
- les esters tributyriques du glycérol
- les esters trioléiques du glycérol (203).

Avec les esters du beta-naphtol et du para-nitro-phénol, la mise en évidence des lipases se trouva encore simplifiée, d'autant plus que l'hydrolyse des esters du para-nitrophénol libérait du para-nitrophénol jaune, permettant ainsi de suivre visuellement la cinétique de la réaction (86) (129). Par la suite, on a montré que seules les lipases pouvaient agir sur ces esters et que la valeur de ces dernier égalait, sur le plan théorique, celle des tweens (86) (129). Parmi les derniers substrats employés, nous citerons les esters du 2-7 dihydroxynaphtalène, dont les propriétés sont analogues aux précédentes (187).

Malgré de récentes études intéressantes sur les substrats naturels comme le jaune d'oeuf (157) (169), on tend maintenant à n'utiliser que des corps synthétiques, d'emploi plus aisé et permettant une normalisation. Les résultats d'un substrat à l'autre ne sont pas toujours comparables, mais on peut connaître la cinétique de chacun d'eux. Delmotte a montré que l'Emullat 06 ainsi que les Tweens 20 et 40 étaient les plus rapidement hydrolysés et on constate que plus la chaîne d'acides gras s'allonge, plus l'action lipasique diminue (56). Le tableau ci-dessous permettra de mieux apprécier cette cinétique (187).

En donnant à l'ester caprilique la vitesse d'hydrolyse 100, on obtient

pour l'ester caproïque	"	"	64
pour l'ester laurique	"	"	37
pour l'ester myristique	"	"	28
pour l'ester palmitique	"	"	7
pour l'ester stéarique	"	"	7

Si les résultats, obtenus par ces techniques, sont indiscutables, il en est tout autrement de leur interprétation. Pour Delmotte (56), 99 % des Staphylococcus "coagulase positive", prélevés dans des lésions possèdent une lipase, pourcentage ramené à 91 % par Krynski et à 75 % par Vogelsang (110) (191).

Avec les souches sans coagulase, les écarts sont encore plus grands, 10 % pour Delmotte (56) et 75 % pour Krynski (109). En ne tenant plus compte de l'épreuve de la coagulase, mais uniquement de l'origine du prélèvement, Jessen (97) n'a trouvé des lipases que chez 40 % des souches ayant entraîné une septicémie. Rosenthal (161) a confirmé ces travaux, car il constate très souvent l'absence de lipases chez les Staphylococcus du lysotype 80-81-80/81, réputés pathogènes.

A défaut de la coagulase, les hémolysines seraient à l'épreuve se rapprochant le plus de celle des lipases. Les souches possédant une alpha-hémolysine, hydrolyseraient les Tweens 60 et 80, tandis qu'à la beta-hémolysine correspondrait le Tween 20. Quant aux autres Staphylococcus, sans hémolysines, ils n'attaqueraient que les esters d'acide gras à chaîne courte (119).

Il est difficile de tirer un enseignement valable de l'épreuve des lipases, car elle a une valeur insuffisante pour caractériser Staphylococcus aureus. Delmotte (56) suggère que le caractère inconstant de cette enzyme provient de son instabilité, elle-même due à la grande facilité d'adaptation des lipases, qui peuvent perdre également cette acquisition passagère, par suite d'un vieillissement, par exemple. Aussi, nous ne pourrions pas nous adresser à cette seule épreuve pour définir Staphylococcus aureus.

B - EPREUVES SECONDAIRES

1° - Recherche des hémolysines

On distingue quatre types d'hémolysines. :

L'Hémolysine α qui est caractéristique de l'espèce humaine. Elle agit in vitro sur les hématies de Lapin.

L'Hémolysine β qui est très fréquente chez les animaux. Elle peut hémolyser les hématies de Mouton.

L'Hémolysine γ qui est active sur les hématies de Lapin ou de Mouton.

L'Hémolysine δ qui est active sur les hématies de l'Homme ou du Cheval (115) (192) (59).

La mise en évidence des hémolysines peut se faire de plusieurs façons, soit sur boîte de Pétri (78) (93), soit en tube avec un filtrat de culture (62), soit enfin par précipitation à l'aide d'un immun-sérum (119).

Pour Elek (62), tous les Staphylococcus pathogènes possèdent une ou plusieurs hémolysines. Ainsi 82 % des Staphylococcus "coagulase positive", ont des hémolysines α et δ ; les 18 % restant, ayant soit une hémolysine α , β ou γ .

Quant aux hémolysines des souches sans coagulase, leur taux et leur intensité sont très faibles (106) (62).

Bien que cette épreuve semble refléter, d'une manière assez rigoureuse, le pouvoir pathogène des Staphylococcus, Kocur et Precechtel (106) ont montré que les hémolysines n'étaient pas toujours présentes dans les staphylococcies. Il est donc nécessaires de rechercher d'autres critères.

2° - Recherche de la fibrinolysine

La fibrinolyse fait suite à la coagulation du fibrinogène sous l'influence de la coagulase. On pourra donc, soit faire une épreuve globale, soit mettre en évidence la fibrinolyse uniquement, en opérant dans un milieu contenant de la fibrine, obtenue à partir du plasma de Lapin, de Mouton, ou plus rarement d'Homme. On suit la fibrinolyse au bain-marie, à 37° C, en prenant note des temps (59).

En présence de souches "coagulase positive", Jacobs (93) obtient la fibrinolyse dans 67 % des cas, et Pillet (144) dans 80 % des cas. Pour les Staphylococcus "coagulase négative", ce pourcentage tombe entre 0 et 10 %, suivant les auteurs. Il semble par ailleurs que cette épreuve puisse servir à différencier les souches d'origine humaine de celles d'origine animale, car ces dernières ne montreraient pratiquement pas d'activité fibrinolytique (119). En raison du manque de précision de l'épreuve de la fibrinolysine, ce critère ne pourra pas définir le pouvoir pathogène de Staphylococcus aureus.

3° - Recherche de la désoxyribonucléase

Sur un milieu nutritif contenant de l'acide désoxyribonucléique obtenu à partir de thymus de veau, la désoxyribonucléase des bactéries conduit à l'hydrolyse de ce substrat. Après un temps de réaction variable, l'addition d'acide chlorhydrique non hydrolysé, par opacification du milieu, tandis que l'on observe une plage claire partout ailleurs (93) (122).

Cette épreuve est empirique et les résultats manquent de précision; il semble qu'elle soit toujours positive chez Staphylococcus "coagulase positive", alors que 2 % seulement des autres Staphylococcus, sans coagulase, réagiraient dans ce cas.

4° - Recherche des protéinases et des peptidases

La mise en évidence de l'existence de ces enzymes ne nécessite pas de substrats particuliers. Lieb (111) propose l'albumine, les globulines, le fibrinogène, ou la caséine. Après incubation et addition d'acide chlorhydrique, on peut noter l'éclaircissement du milieu, dû à la dénaturation des protéines, ou bien doser l'ammoniaque dégagé. On a également utilisé la gélatine (84), le sang de Mouton chauffé (93), le lait écrémé (71). Mac Donald (114) (72) a expérimenté un substrat synthétique, le L-leucyl- β -naphtylamide, qui par hydrolyse libère le naphtylamide, que l'on peut alors doser. Ce procédé donne une idée de la spécificité de l'enzyme, et apporte des résultats quantitatifs (154-155).

On ne doit pas attendre de réponses très significatives des méthodes précédentes, par suite de leur empirisme et de la diversité des substrats utilisés. On trouve que 56 à 100 % des souches "coagulase positive" sont pourvues de protéinases, tandis que pour les Staphylococcus "coagulase négative" on trouve entre 3 et 71 % de positivité, ce qui ne permet pas de tirer des conclusions générales sur cette épreuve (84) (93).

5° - Recherche de l'uréase

La mise en évidence de l'uréase, en utilisant l'urée comme substrat, apparaît comme une réaction assez simple. En effet, on introduit la souche à étudier dans un milieu nutritif contenant de l'urée et la dégradation du substrat est suivie de la libération d'ammoniaque qui agit sur un indicateur de pH. Le mode opératoire varie malheureusement d'un auteur à l'autre; certains préfèrent le

rouge de phénol, d'autres la phénolphtaléine (125). De même, le temps de réaction varie de quelques heures à plusieurs jours. Or de telles modifications entraînent des résultats totalement différents.

En effet, on aura une réaction d'autant plus positive que l'on utilisera une gamme de pH plus basse (6,4 à 8,0) (206) (207), tandis qu'avec la phénolphtaléine il faut un pH franchement alcalin (8,2) pour obtenir le virage.

Certains auteurs préconisent l'emploi de l'indicateur dans le milieu de réaction, d'autres préfèrent suspendre un papier pH au-dessus du milieu.

Enfin, Wysocki (206) considère que le temps nécessaire pour achever la réaction doit être de sept jours, voire même de deux semaines dans certains cas. Mais dans de telles conditions, il n'est pas sûr que l'ammoniaque produit vienne uniquement de l'urée, le milieu nutritif pouvant lui aussi être catabolisé.

Quelques résultats (207) illustrent ces difficultés :

Indicateur	Résultats obtenus avec des Staphylocoques "pathogènes"		
	% de positivité après incubation de 24 heures	2 jours	6 jours
Rouge de phénol dans le milieu	9 %	63,3 %	94,7 %
Phénolphtaléine dans le milieu	0	1,3 %	81,7 %
Mise en évidence de NH_3 au-dessus du milieu avec papier pH : 6,8-8,0	10 %	65,3 %	94 %

Quant à Müller (125), il obtient les résultats suivants : 32 % de positivité pour Staphylococcus "coagulase positive" et 76 %

de positivité pour Staphylococcus "coagulase négative" en faisant sa lecture après 96 heures d'incubation, en présence de phénolphtaléine comme indicateur de pH.

Wysocki (207), choisissant des souches "coagulase positive", trouvait que 97,3 % d'entre elles étaient capable de dégrader l'urée, après 14 jours d'incubation, en présence du rouge de phénol comme indicateur de pH.

Les plus infectieux des staphylocoques pathogènes seraient incapables de cataboliser l'urée. Il semble que l'absence d'uréase soit un bon critère de pathogénicité, alors que tous les autres caractères des Staphylococcus se distinguent dans ce cas par une intense activité métabolique. Toutefois devant des résultats aussi discordants, on doit garder une prudente réserve.

C - LYSOTYPIE

La première observation de la lyse bactériophagique est due à Twort (188) qui s'aperçut que certaines colonies, à la surface d'un milieu de culture, prenaient un aspect de "plages vitreuses". Twort attribua ce phénomène de lyse soit à une enzyme, soit à une particule autoreproductrice et infectieuse que Félix d'Hérelle mit en évidence et nomma bactériophage (57). Par la suite Williams et Timmins s'intéressèrent aux phages des Staphylococcus (202). Fisk (67) (68) ayant lysotypé des bactéries à l'aide de sa collection de phages, détermina trois groupes : - les bactéries sensibles aux phages

- les bactéries insensibles aux phages

- les bactéries lysogènes.

Ces dernières présentent un état de résistance apparent, détruit par le hasard ou des facteurs d'induction tels que les rayons U.V. par exemple.

Fisk constata que les souches sensibles aux phages, dont il disposait, était pathogènes.

D'importants travaux entrepris ultérieurement aboutirent à la création de techniques de lysotypie, adoptées par Wilson, Williams et Blair en Grande-Bretagne (204) (201) (19) (20) et par Wahl, en France (193) (194) (195).

En 1958, le Sous-Comité de Lysotypie du Staphylocoque proposa la constitution d'un soucier de vingt-et-un phages, qui permet de reconnaître environ 75 % des Staphylococcus pathogènes, en les répartissant en cinq groupes (191). En France, on possède maintenant vingt-deux bactériophages, répartis en quatre groupes; de plus on a souvent recours à l'emploi de types et de groupes mixtes pour l'identification des souches (147). Ces dernières années, les types 80, 81 et 80/81 se signalent par leur appartenance au groupe des Staphylococcus les plus pathogènes (161) (97) (166).

La lysotypie permet de suivre à la piste une souche donnée et de reconnaître sa participation dans une épidémie. La lysotypie est un caractère génétiquement stable et les variations envisagées par Wahl n'influent que sur la qualité de la lyse (195) (196) (197).

C'est en début d'épidémie que la lysotypie offre le maximum d'intérêt, car l'identification des souches est d'autant plus malaisée qu'on aura laissé, aux bactéries, le temps de se disperser et de se multiplier, augmentant ainsi les chances de lysogénie et donc l'immunité vis-à-vis des phages virulents utilisés pour la diagnose (197).

Dans l'état actuel des choses, l'application de la lysotypie dans le but de classification de Staphylococcus n'offre que des possibilités restreintes : elle ne permet pas de mettre en évidence les staphylocoques saprophytes et chez les pathogènes, 10 à 25 % échappent à ce recensement. Seuls sont lysotypables, les Staphylococcus qui possèdent une coagulase; si cette enzyme disparaît par vieillissement de la souche, on ne pourra plus lyser celle-ci. Toutefois, par repiquage, la bactérie peut retrouver sa coagulase; dans ce cas elle peut à nouveau être lysotypée (16).

Cette méthode, malgré des avantages certains, demeure imparfaite car elle ne s'applique pas à de nombreux Staphylococcus dépourvus de coagulase, et par ailleurs elle contrôle incomplètement l'ensemble de Staphylococcus aureus.

D - SEROTYPAGE

Kolle (108) en 1902, constata que le sérum d'un malade agglutinait des Staphylococcus prélevés dans un pus de ce même sujet; c'était la première observation concernant la sérologie de ces bactéries. Par la suite Julianelle, Wieghard et Hine jetèrent les bases d'une classification en divisant les Staphylococcus en deux groupes; les pathogènes et les non-pathogènes (100) (99) (83). Au cours de ces études, un antigène, le Polysaccharide A fut découvert; on lui attribua la virulence de Staphylococcus.

Les travaux de Yonemura et de Cowan (208) (47) (46) permirent un classement de Staphylococcus en cinq groupes et neuf types. Ces groupes furent désignés par les chiffres romains, le groupe V étant composé de souches inclassables. Cowan introduisit la technique d'agglutination sur lames, méthode qu'il utilisa au cours de sa classification. Il montra que Staphylococcus représentait un groupe plus homogène, du point de vue sérologique, que celui des staphylocoques saprophytes. Toutes les souches ne sont pas agglutinables; les deux-tiers, seulement, répondent à ce critère, le reste donnant des réactions atypiques, ce que Cowan interprétait comme dû à une trop grande complexité antigénique.

Christie et Keogh (38) essayèrent d'établir une comparaison entre l'origine des Staphylococcus et leur type sérologique. Sur les neuf types de la classification, les trois premiers comprenaient des souches de prélèvements de gorge, tandis que les cinq autres provenaient d'ostéomyélites, de furoncles ou de septicémies. Ils constatèrent également que le sérotype d'une souche pouvait être le même, bien que celle-ci ait été prélevée dans les fosses nasales et dans un abcès d'un même sujet.

Le nombre des sérotypes fut successivement ramené à trois, puis à sept, par Andersen et Betty (3) (16), tandis que la liste des

antigènes s'allongeait. On proposa d'appeler les antigènes au moyen des lettres de l'alphabet a, b, c, d, ... (75) (76) (77) (81). Finalement le nombre des sérotypes reconnus est, en France, de dix-neuf, en ce qui concerne les staphylocoques pathogènes (147).

Alors que la préparation des immun-sérums est longue et délicate, la mise en pratique de la sérotypie est simple, mais cette dernière n'a pas connu le développement qu'elle méritait. Le manque de stabilité antigénique des souches a été longtemps une critique. En effet certains auteurs (141) avaient constaté un changement de sérotype au cours des repiquages successifs, alors que d'autres (74) (75) n'avaient observé qu'un affaiblissement des réactions antigéniques. Par inoculation chez l'animal, on peut retrouver le sérotype original. Bien que l'influence des antibiotiques sur le sérotype ait été envisagée (145) il semble bien que la spécificité sérologique demeure un caractère constant (180). On admet à l'heure actuelle qu'il s'agit d'un facteur héréditaire. On peut caractériser environ 90 % des souches pathogènes, par la sérologie car moins de 10 % sont non typables et 1 % autoagglutinables (145) (146) (189). Quant aux souches non pathogènes, le pourcentage des souches typables varie entre 16 et 57 % (145) (4).

Comme dans le cas de la lysotypie, on pourra avec cette méthode, mettre en évidence l'origine d'une infection, mais il sera difficile d'affirmer le pouvoir pathogène d'une souche. Ces dernières années, par exemple, les Staphylococcus des sérotypes 18 et 14 ont été à l'origine de nombreuses infections, mais il n'est pas possible d'attacher, provisoirement, un caractère pathogène à une souche, sous prétexte qu'elle appartient à l'un de ces deux sérotypes (147) (74) (189) (133).

En choisissant convenablement les souches de bactériophages on a pu établir une bonne corrélation entre la sérologie et la

lysotypie (133) (145) (131). L'hypothèse d'un site commun pour les récepteurs des agglutinines et des phages avait même été envisagée (145), mais il semble bien que ce ne soit qu'une supposition (132). Les partisans de la sérologie trouvent en elle une technique simple et rapide, dont on peut reprocher les réactions croisées (39) (150). On peut préférer la lysotypie qui, offrant une plus grande variété de type, est plus précise (30). En fait ces deux techniques se complètent car les souches non lysotypables sont généralement sérotypables et réciproquement. Toutefois on doit signaler une impossibilité de typer les bactéries d'origine animale avec les réactifs adaptés aux souches d'origine humaine (12), mais le principal défaut que l'on puisse reprocher à ces méthodes réside dans l'incapacité de ces dernières à distinguer avec certitude les staphylocoques pathogènes.

E - PRODUCTION DE LYZOZYME

La lyse de Staphylococcus par une enzyme du blanc d'oeuf est une découverte déjà ancienne, puisque Thompson (186) la mentionna en 1935. Mais ce n'est qu'en 1959 que Welsch (199), Kashida (103) et Richmond (156) remarquèrent la présence de lysozyme dans le milieu de culture de certains Staphylococcus et en fonction de son activité cette enzyme fut appelée successivement "enzyme lytique", "enzyme ressemblant au lysozyme", puis "lysozyme" tout court.

Un rappel des principales propriétés du lysozyme facilitera la compréhension de son mécanisme d'action.

Historiquement, Nicolle en 1907 fut le premier à s'être aperçu des propriétés lytiques du lysozyme, dont Fleming montra la présence dans de nombreux milieux comme le mucus nasal, les bactéries et le blanc d'oeuf (130). Le lysozyme d'oeuf de poule a un caractère basique, son poids moléculaire est de 15000, il comprend 129 acides aminés (95) (98). La production de lysozyme dans les cultures bactériennes est en relation avec le caractère lysogène des souches cultivées. Les phages mûrs possèdent en effet un lysozyme fixé à l'extrémité de la queue qui peut permettre de provoquer l'altération de la paroi, nécessaire à l'injection du DNA du phage dans la bactérie, au premier stade de l'infection. C'est également la production de lysozyme à l'intérieur de la bactérie au moment de la maturation des phages qui permet la destruction de la paroi bactérienne et la libération des phages mûrs, dans le milieu (14). Le lysozyme attaque la liaison β 1-4 entre la N-acétyl-glucosamine et l'acide N-acétyl-muramique que l'on rencontre chez certains mucopeptides représentant un élément essentiel de la structure de la paroi ectoplasmique des bactéries. Chez certaines espèces appartenant aux genres Bacillus et Sarcina, ce substrat est directement accessible et le lysozyme provoque leur lyse rapide à des concentrations de 10^{-3} à 10^{-4} moles (167) (168). Chez d'autres espèces,

le substrat n'est pas directement accessible et il est nécessaire de faire subir un traitement préalable par l'EDTA, dans le cas des Enterobactéries, pour provoquer la lyse (44).

Les substrats muréiques riches en restes glutamiques ou en groupements O-acétyl offrent une grande résistance à l'enzyme, de même que certaines structures peptidiques très ramifiées, comme c'est le cas chez Staphylococcus aureus (14).

In vitro, on a observé un accroissement de la phagocytose en présence de lysozyme qui attaque la paroi des bactéries, facilitant ainsi le travail des leucocytes (6) (54). On a également constaté, dans des conjonctivites, une diminution du taux de lysozyme, ce qui semblerait lui conférer un rôle antiinfectieux (136). Enfin Webb (198) a prouvé que le lysozyme pouvait entraîner chez des bactéries à Gram positif, tués par la chaleur, une transformation en Gram négatif, ce qui met en évidence, chez cette enzyme son attrait sélectif pour la paroi cellulaire.

Les travaux effectués sur le lysozyme des Staphylococcus ont porté sur la mise en évidence de la production de cette enzyme, en utilisant Micrococcus lysodeikticus comme substrat. Pour cela, un liquide de culture de Staphylococcus, contenant éventuellement du lysozyme, est ajouté à une suspension de Micrococcus lysodeikticus tué, dont la lyse entraîne la clarification du milieu.

Pour Kashida (103), la production de lysozyme est un critère absolu de pathogénicité. Ayant comparé les résultats de cette épreuve et ceux de la coagulase, Jay (94) constate une similitude de 95 % tandis que Goldbach ramène ce taux à 65 % (71). Mais 8 à 35 % des souches "coagulase négative" produisent du lysozyme; aussi Jay et Goldbach estiment cette épreuve insuffisante pour affirmer le pouvoir pathogène et proposent d'y associer la recherche des hémolysines ou des protéinases.

CHAPITRE III

POUVOIR PATHOGENE ET VIRULENCE

Aux termes de cette étude sur les métabolismes de Staphylococcus, il serait intéressant de mettre en évidence une corrélation éventuelle entre l'infection chez l'homme, st les facteurs de virulence. Si l'on admet qu'une souche est généralement pourvue d'un haut potentiel enzymatique, qui s'exprime par des enzymes telles que la coagulase, les phosphatases, les lipases, la DNase (147), par contre la possession d'un tel potentiel n'est pas l'indice formel d'un pouvoir pathogène. Avant d'aborder plus en détail ce sujet, il convient de préciser le sens des expressions, communément employées et trop souvent confondues, telles que le "pouvoir pathogène" et les "facteurs de virulence".

Ivler (91) estime que la virulence est due à la production de substances extra-cellulaires, diffusibles, pouvant éventuellement être la cause du pouvoir pathogène, que Williams (202) décrit comme "la capacité inhérente à une espèce ou à un groupe d'organismes, d'engendrer une maladie". Selon les auteurs, le terme de virulence peut aussi bien exprimer l'idée de sa capacité de dissémination, de multiplication, ou même de fixation (202) (90). Pour Hoeprich, "virulence" et "toxicité" pour l'animal sont deux notions connexes, alors que le caractère pathogène traduit l'aptitude à créer des lésions purulentes (84).

D'après Blair (18) (21), il est possible de classer les facteurs de virulence en deux grands groupes : d'une part ceux qui

permettent aux staphylocoques de coloniser l'hôte et de créer une infection - ce sont la coagulase, la leucocydyne, et la hyaluronidase -, et d'autre part ceux qui endommagent les tissus ou affectent leurs fonctions normales - ce sont les toxines et les hémolysines.

Si l'on admet de réduire le rôle de la toxine à celui d'un facteur de virulence, on adopte une position restrictive, car il est bien certain qu'elle participe à la détermination du caractère pathogène du staphylocoque, sans toutefois s'assimiler entièrement à lui. Cet exemple illustre bien les difficultés rencontrées lorsqu'on veut donner une définition suffisamment précise, ce qui peut expliquer l'utilisation, dans la littérature scientifique, d'une expression à la place de l'autre.

Conservant le plan adopté par Blair, nous allons en examiner successivement les deux subdivisions. Considérons tout d'abord les facteurs permettant aux staphylocoques de coloniser l'hôte et de créer une infection :

1. L'épreuve de la coagulase

On a montré que les staphylocoques pouvaient mieux se développer et résister à la phagocytose du fait de leur coagulase, car cette enzyme permet la formation d'une barrière de fibrine (184) (185); même in-vitro, on constate que la phagocytose par les microphages des staphylocoques à coagulase positive, est plus facile que celle des autres bactéries (80).

Blair (21) a démontré que les animaux dont le plasma résistait à l'action de la coagulase, étaient en général réfractaires à la maladie; toutefois il suffirait de leur injecter un plasma hétérologue, coagulable, pour renverser cette immunité.

Un autre type de mécanisme d'action de la coagulase a été suggéré : celle-ci pourrait bloquer un facteur sérique, inhibiteur

de la croissance bactérienne, et permettrait ainsi la multiplication des staphylocoques (174) (175). Pour Ekstedt (60), le sérum humain, par l'intermédiaire d'un facteur antibactérien de nature inconnue, n'agirait que sur les staphylocoques dépourvus de coagulase laissant ainsi le champ libre aux autres.

On peut attribuer plusieurs rôles, différents d'ailleurs, à la coagulase. En effet, pour Rammelkamp (153), la fibrine formée aurait une action bénéfique, car elle bloque le germe à son niveau; or l'enfant, plus démuní que l'adulte en C.R.F. (coagulase-reducing-factor), n'opposerait que de faibles barrières de fibrine devant la croissance staphylococcique, entraînant ainsi la diffusion de l'infection. Il semble donc que la formation de fibrine soit une arme à double tranchant : d'une part, le caillot tend à limiter la diffusion du germe dans l'organisme, permettant ainsi une action locale des défenses naturelles, et d'autre part, si le staphylocoque est enfoui dans la masse de fibrine, la phagocytose n'aura guère de prise sur lui, et à partir de ce moment-là ne pourra plus empêcher son développement.

Pour Smith et Blobel (22) (176), le rôle de la coagulase s'exerce beaucoup plus profondément : non seulement le taux de fibrinogène diminuerait sous l'action de la staphylocoagulase, mais aussi celui des protéines totales, ce qui entraînerait une diminution des anticorps et un affaiblissement des défenses qui ne s'opposeraient plus alors à une croissance bactérienne.

Devant ces résultats, on serait tenté de conclure que l'épreuve de la coagulase définit suffisamment la virulence in-vitro, et le pouvoir pathogène, sans qu'il soit besoin de le faire davantage. Or d'autres preuves, non moins évidentes que les précédentes, nous conduisent à un certain scepticisme. En présence de staphylocoques, dépourvus ou non de coagulase, Shinefield (171) a expérimenté le pouvoir phagocytant des leucocytes : il n'a enregistré aucune

différence. De plus le titre d'anticoagulase sérique ne présente aucune corrélation avec le degré de l'infection ou de la résistance à la maladie. Enfin, on pourra rappeler ici, le fait que des mutants dépourvus de coagulase conservent un pouvoir infectieux aussi intense que leurs ascendants à coagulase positive (102) (171). Cet exemple serre de près la réalité, car on ne dénombre plus les endocardites à staphylocoques sans coagulase, ni les prélèvements sur des porteurs sains, de souches à coagulase positive.

A toutes ces contradictions apparentes, des explications ont été apportées. On a abandonné l'idée de faire de la coagulase l'épreuve-clé dans la détermination du pouvoir pathogène, tout en lui accordant la valeur d'un caractère de classification. On a reconsidéré la question de la coagulase, en la comparant à d'autres épreuves. La consommation d'oxygène (définie par le QO2) atteint une valeur élevée avec les Staphylococcus ayant une coagulase, contrairement à ceux qui en sont dépourvus. Toutefois il suffirait d'adjoindre de la coagulase au milieu de réaction pour atteindre, avec les souches "coagulase négative", une consommation d'oxygène identique aux autres souches (91).

Ivler a recommencé cette expérience en se basant sur le pouvoir protéolytique de Staphylococcus avec ou sans coagulase. Au départ Ivler a dosé les acides aminés contenus dans le milieu d'étude, appauvri en substances nutritives, et dans Staphylococcus lui-même. Deux heures plus tard, l'analyse révèle que les réserves d'acides aminés des souches possédant une coagulase, ont diminué de 41 %, alors que ce pourcentage s'abaisse à 21 % quand il s'agit de souches sans coagulase; dans ce dernier cas cette diminution ne concerne les réserves propres des bactéries qu'à raison de 10 %.

A partir d'une telle expérience, quelques conclusions s'imposent d'elles-mêmes : la respiration interne et le métabolisme azoté sont liés à la notion de virulence, caractérisant ainsi les

bactéries qui possèdent une intense capacité de production de substances protéiques extra-cellulaires. Celles-ci en cas de besoin seraient ravitaillées par ces mêmes produits, conjointement à ceux fournis par l'hôte; elles pourraient ainsi maintenir un métabolisme très élevé, contrairement aux Staphylococcus avirulents qui ménagent leurs réserves d'acides aminés, par suite de leur incapacité à en fabriquer (91).

A propos des bactéries pathogènes et sur un plan plus général Ivler conclut : "...Les germes seraient mieux équipés pour se fixer avec succès dans les tissus de l'hôte, combattre ses mécanismes de défense, et provoquer la maladie... La protection contre la phagocytose et la plus longue survie intraleucocytaire pourraient être expliquées par ce mécanisme..." (91).

Dans une dernière série de travaux, Ivler a cherché si un intense métabolisme azoté était lié aux souches possédant une coagulase ou bien à celles qui engendraient les lésions. En choisissant des Staphylococcus tous prélevés dans des endocardites, on ne distingue plus les résultats de la consommation d'oxygène en fonction du taux de coagulase, ce qui semblerait démontrer que la coagulase ne serait qu'un moyen commode de rattacher la virulence à une bactérie, mais ce rapport disparaît ou même s'inverse, dès qu'on examine une souche dermonécrotique sans coagulase. La solution qui consiste à comparer le métabolisme azoté ou la respiration interne au pouvoir pathogène, apparaît comme bien meilleure et cernerait de plus près la réalité. Kedzia a fait une remarque analogue : en s'adressant aux métabolismes de l'acide glutamique et des phosphates, il avait constaté que les Staphylococcus provenant de lésions se distinguaient toujours par une activité plus intense que les autres (104).

2. La leucocydine, facteur de virulence.

Grâce à cette enzyme, le Staphylococcus résiste à la phagocytose par les leucocytes, ce qui permet son développement ultérieur. Non seulement, la leucocydine protège les Staphylococcus mais elle leur permet aussi de s'attaquer aux leucocytes; on a même mis en évidence des formes vivantes de Staphylococcus dans les leucocytes (21) (158).

Bien que l'existence de la leucocydine ne soit plus actuellement remise en question, son importance a bien baissé depuis la mise en évidence et le dosage des antileucocydines sériques. Les résultats obtenus prouvent que 21 % des souches ayant entraîné des lésions graves, ne possèdent pas de leucocydines, ce qui autorise à n'attribuer qu'une attention minime à ce facteur de virulence.

3. Importance de la hyaluronidase.

Avec cette enzyme, nous nous trouvons devant une double potentialité. D'une part, la hyaluronidase favorise les défenses normales de l'organisme en leur permettant d'atteindre les bactéries, mais d'autre part celles-ci et leurs toxines acquièrent une meilleure diffusion. Le dosage des antihyaluronidases peut donner des résultats valables, mais il ne faut pas oublier que, in vitro, la mise en évidence de cette enzyme est souvent négative; peut-être ne s'agit-il que de mauvaises conditions de culture ! Il est d'ailleurs assez fréquent de trouver une profonde discordance entre les épreuves in vivo et in vitro, comme le signale Blair (21).

Considérons maintenant les facteurs de virulence qui endommagent les tissus ou affectent leurs fonctions normales.

1° - Les hémolysines

Chez l'homme, l' α hémolysine n'a que peu d'effet. Quant à la δ hémolysine, quoique douée d'un pouvoir hémolytique, elle ne semble pas capable de provoquer des désordres importants pour l'organisme humain. De plus elle est pratiquement sans action pour l'animal, n'entraînant ni nécrose ni mort par voie intra-veineuse (21).

2° - L'exotoxine

Son pouvoir nécrosant est indiscutable. Elle est capable d'entraîner la mort et ceci peut être mis en évidence chez l'animal. Mais 50 % seulement des souches ayant entraîné des lésions possèdent cette capacité. Par contre, même en bloquant l'action de la toxine par une antitoxine, l'animal pourra encore faire des abcès (171). La toxine, par sa situation privilégiée entre la virulence et le pouvoir pathogène (car c'est sans doute le seul produit extra-cellulaire que l'on puisse mettre en évidence aussi bien in vivo que in vitro par sérologie ou par toute autre méthode physico-chimique) aurait pu être le chaînon intermédiaire entre l'épreuve de laboratoire et le pouvoir pathogène; malheureusement, les statistiques prouvent que 50 % seulement des Staphylococcus élaborent cette toxine, ce qui permet d'envisager d'autres hypothèses.

3° - L'entérotoxine

La contamination des aliments par Staphylococcus est un événement fréquent contrairement à l'empoisonnement dû à l'entérotoxine, car en fait peu de souches produisent cette toxine (21). Ce type d'intoxication pourrait fournir une preuve du caractère pathogène d'une souche vu que tout le monde réagit également devant l'entérotoxine, mais d'une part les symptômes ne sont que passagers et

bénins en général et par ailleurs très peu de souches possèdent cette toxine ce qui exclut ce facteur de la recherche du pouvoir pathogène.

Rogers et Spensley ont donné une nouvelle orientation à ces recherches : pour eux la production enzymatique et la croissance bactérienne sont deux phénomènes différents, car en bloquant la coagulase, la hyaluronidase ou les hémolysines par des molécules artificielles, on n'empêche pas le développement du germe (159). La sérologie a permis de déterminer quelques facteurs de résistance bactérienne. C'est ainsi qu'on a trouvé un antigène de surface, chez le staphylocoque, qui lui permet de résister à la phagocytose (121). Ekstedt a montré qu'il existait, dans le sérum, un anticorps anti-acide-teichoïque, jouant un rôle dans la phagocytose; or, on s'est aperçu que certaines souches "Smith" fabriquaient en excès cet acide teichoïque qui, en formant une enveloppe, protégerait la bactérie et bloquerait l'anticorps. Toutefois Ekstedt reconnaît qu'il s'agit ici d'un cas particulier, et il conclut lui-même : "aucune toxine, aucun métabolite issu des staphylocoques ne possède un caractère fondamental de virulence, comme c'est le cas de la toxine diphtérique par exemple. Aucun antigène capsulaire ou de membrane n'est indispensable à la virulence des staphylocoques..." (61). Tout en admettant qu'il existe peut-être des enzymes ou des métabolites non encore identifiés et pouvant jouer un rôle primordial, Blair suggère que les facteurs de virulence ne sont que "...des notions forgées par l'homme et servant uniquement de repères pour définir des souches ayant la capacité potentielle d'engendrer la maladie..." (21).

Devant l'échec de l'analyse des facteurs de virulence, Rountree s'est tourné vers l'hôte récepteur des bactéries. Constatant qu'une bactérie peut entraîner une infection mortelle chez une espèce et être non pathogène pour une autre (Kryniski (104) (110) avait déjà observé un semblable phénomène avec un staphylocoque

prélevé chez un porteur sain, mais toxique pour la souris), Rountree avait mis en cause la relation hôte-parasite, normalement en équilibre (163). Une question se pose alors : en cas de troubles infectieux doit-on rendre responsable le parasite ou l'hôte, ce qui revient à dire : le parasite devient-il virulent ou bien l'hôte plus susceptible ?

De nombreux facteurs interviennent au cours d'une infection, parmi lesquels on peut citer les suivants :

- le rôle du porteur : sa présence est d'autant moins nécessaire que le germe diffuse plus vite et qu'il survit mieux en dehors même d'un hôte.

- le nombre de germes nécessaires à l'infection : pour amener un début d'abcès, expérimentalement, il faut de deux à cinq millions de germes; or, dans les conditions normales, jamais une telle quantité ne se trouve réunie en un seul point (63). Mais qu'un facteur extérieur intervienne, comme par exemple une suture ou une prothèse, alors le staphylocoque profite d'un abri mécanique pour s'introduire et s'installer. En même temps, dans l'organisme de l'hôte peut se manifester une intolérance vis-à-vis du corps étranger; cet antagonisme favorise l'implantation de la bactérie et sa croissance. Dans de telles conditions la capacité infectante bactérienne peut se trouver multipliée par dix mille.

Les tissus tuméfiés ou brûlés forment également un terrain de prédilection pour l'infection, surtout lorsqu'ils créent une semi-anaérobiose avec les pansements.

D'autres facteurs interviennent également, mais leur rôle est plus complexe. Il s'agit des corticoïdes, des antibiotiques, des cas de dénutrition brutale, plus graves qu'une sous-alimentation chronique, de l'âge, de la localisation des staphylococcies, du climat, de l'hygiène....

Normalement, il est bien prouvé que l'homme résiste d'une façon étonnante à l'infection. Sans doute les anticorps prennent une part importante dans cet équilibre, bien que des antitoxines ou des anticoagulases aient été essayées, sans succès, à titre préventif. Deux anticorps ont été récemment découverts : l'un est dirigé contre un polysaccharide de surface et fonctionnerait comme une opsonine, tandis que l'autre, dirigé contre certains antigènes protéiques interviendrait dans la destruction intra-cellulaire du germe (61). Dans le cas d'une infection, on assiste souvent à une diminution des immunoglobulines, mais s'agit-il de la cause ou de la conséquence de l'invasion microbienne ?

En comparant le métabolisme global d'un microorganisme et l'état général de son hôte, on constate que le rapport varie en sens inverse et il suffirait de deux épreuves comme du coefficient respiratoire des staphylocoques et du taux des anticorps sériques du sujet pour en donner une bonne appréciation (101).

Après l'essai in vitro, puis in vivo sur l'animal, certains bactériologistes ont voulu se montrer plus réalistes, en prenant l'homme comme sujet d'expérience. Williams signale avoir trouvé au moins trois références différentes relatant une expérimentation humaine. Mais les conclusions de ces expérimentateurs trop zélés n'ont rien apporté de plus : certains patients ont été atteints de staphylococcies très graves, mais d'autres, en revanche, n'ont rien ressenti du tout (202). La conclusion de Richou s'applique à ce type d'expérimentation : "...en fait le pouvoir pathogène d'un staphylocoque n'apparaît pas comme une propriété intrinsèque du germe. C'est pourquoi, lorsqu'on recherche "in vivo" si un staphylocoque est doué de pouvoir pathogène, on pourra seulement dire que dans les conditions expérimentales utilisées, ce staphylocoque s'est montré pathogène par exemple pour le Lapin, le Cobaye ou la Souris, sans pouvoir en inférer les symptômes qu'il engendrerait chez l'Homme..." (119).

Plutôt que la réalisation d'une seule épreuve, une étude d'ensemble des caractères aidera mieux à la compréhension d'un métabolisme général, tout en gardant présent à l'esprit qu'une bactérie possède une grande faculté d'adaptation, et qu'un milieu biologique comme notre organisme offre des possibilités beaucoup plus vastes et différentes que celles d'un milieu de culture artificiel, si nutritif soit-il.

CHAPITRE IV

UNE NOUVELLE METHODE D'ETUDE :

AUXOTAB

Nous avons repris l'étude des corrélations existant d'une part entre Micrococcus et Staphylococcus et d'autre part entre l'équipement enzymatique des Micrococcaceae et le pouvoir pathogène, en utilisant une micro-méthode nouvelle mise au point au Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA) de Lyon et dénommée Auxotab^{*}, qui a déjà fait l'objet de plusieurs publications (31) (32) (33) (43) (148) (140).

Dans les épreuves bactériologiques classiques, interviennent généralement tout un groupe d'enzymes plus ou moins liées au point de vue fonctionnel. Il est vraisemblable que des épreuves biochimiques plus étroites permettant d'identifier une enzyme unique, aient une valeur plus précise. C'est ce que permet le procédé Auxotab, où les bactéries sont utilisées, dans un état de non-prolifération, comme un simple réactif chimique capable de modifier ou non un substrat défini. Colobert a montré l'intérêt de cette méthode dans la classification bactérienne (42). On s'efforce de réduire le système à une source d'enzyme et à un substrat chimiquement pur. En changeant systématiquement les substrats, on peut ainsi répertorier l'équipement enzymatique bactérien dans des conditions parfaitement

* Auxotab : Brevet Buissière N° 1356 - 317 INPI

normalisées. Les substrats sont choisis de telle façon que leur catabolisme puisse être mis en évidence par l'apparition ou le changement d'une coloration. On observe par exemple une variation de pH ou de rH décelable par un indicateur coloré ou encore l'apparition d'un produit du métabolisme bactérien spontanément coloré, ou colorable par un réactif.

Deux cas peuvent se présenter; d'une part la transformation du substrat est la conséquence d'une seule enzyme : on recherche, par exemple, une phosphatase par la transformation d'un substrat synthétique de cette enzyme, en l'occurrence le diphosphate de phénolphtaléine. Cette activité enzymatique peut être recherchée aussi bien sur des bactéries vivantes que sur leur broyat et même, après élimination des corps microbiens, dans le milieu où elles se sont développées, lorsque l'enzyme est diffusible. D'autre part la transformation du substrat est la conséquence d'un métabolisme. On recherche, par exemple, la fermentation d'un glucide. On s'efforce d'observer ce métabolisme à l'état pur, mais dans ce cas les bactéries doivent être vivantes et le rester.

La méthode a trois caractéristiques essentielles.

1. La normalisation. Elle est obtenue parce que le dispositif contient un substrat en quantité rigoureusement définie et chaque fois que cela est possible, le réactif nécessaire mettant en évidence la transformation éventuelle de ce substrat.

2. La multiplication bactérienne est inutile. En effet les bactéries sont utilisées uniquement comme source d'enzymes; elles sont cultivées sur des milieux et dans des conditions qui leur sont reconnus le plus favorables. Ce sont des suspensions denses de bactéries, provenant de ces cultures, qui sont inoculées au dispositif.

3. La rapidité de lecture. La vitesse de la transformation du substrat est d'autant plus grande que l'activité enzymatique est plus intense. La cinétique dépend du nombre de bactéries, mais aussi de l'équipement enzymatique particulier à chaque souche. En utilisant des suspensions denses de bactéries vivantes, non proliférantes, les caractères biochimiques peuvent être observés en quelques heures, et c'est une caractéristique de la méthode que d'enregistrer la rapidité d'apparition de chaque épreuve biochimique, de limiter à 24 heures l'observation des résultats et de ne conserver que les caractères qui peuvent apparaître dans ce délai. Il y a à cela de nombreux avantages :

- sur le plan matériel, on évite l'encombrement des laboratoires et des étuves en se débarrassant chaque jour des réactions de la veille.

- sur le plan pratique, les cultures, le milieu de suspension doivent être préparés dans un matériel rigoureusement stérile et les manipulations nécessaires à la préparation des suspensions bactériennes doivent se faire dans les conditions d'asepsie habituelles. Mais, à partir du moment où la suspension dense de bactéries est préparée, les précautions n'ont plus besoin d'être aussi rigoureuses sinon pour éviter toute contamination du personnel.

En effet, l'absence de milieu de culture, la rapidité de transformation du substrat par une suspension pure, de plusieurs dizaines de milliers de bactéries, font que l'activité enzymatique observée dans chaque élément ne peut pas être le fait d'une souillure éventuelle par des bactéries ou des moisissures provenant de l'atmosphère durant l'inoculation et l'incubation. Ceci simplifie considérablement les manipulations, mais surtout, le résultat de réactions biochimiques, obtenu rapidement à partir d'une centaine de millions de bactéries de la même souche, offre plus de certitude que ces mêmes résultats, obtenus plus lentement à partir du développement d'un inoculum de quelques centaines de bactéries, dans un milieu

nutritif complexe. En toute logique, si toutes les bactéries de la même souche possèdent les enzymes nécessaires à la transformation d'un substrat, dans les deux méthodes, le résultat final sera le même. L'expérience montre qu'il en est bien ainsi.

On doit donc faire remarquer dès maintenant que le but recherché n'est pas le remplacement pur et simple des épreuves biochimiques habituellement utilisées. Celles d'entre elles qui recherchent les conditions d'un métabolisme (par exemple l'acidification du glucose en aérobiose et en anaérobiose dans le milieu de Baird-Parker 1965) n'ont de valeur que si l'on s'en tient aux strictes modalités de leur réalisation. De telles épreuves, lorsqu'elles ont une valeur reconnue, sont d'ailleurs codifiées par les Comités Internationaux de Taxonomie et la normalisation ainsi obtenue va dans le même sens que celle qui est recherchée ici.

En somme, AUXOTAB peut être considéré comme une micro-méthode : elle permet l'emploi de substrats très onéreux, parce qu'elle n'en utilise que de très faibles quantités dans chaque élément.

. elle permet l'étude systématique de très nombreux caractères biochimiques sur de très nombreuses souches.

. elle permet d'apprécier la valeur de caractères qui n'ont jamais été recherchés systématiquement et même d'en observer de nouveaux. Une telle méthode d'identification n'aboutit donc pas à créer de nouvelles classifications, mais au contraire répond aux vœux des taxonomistes, quelle que soit la conception qu'il se fassent de la classification.

Description du dispositif

Le dispositif est constitué de plaquettes, en matière plastique inerte, réalisées pour former dix microtubes capillaires

par plaquette. Chaque capillaire comprend deux éléments de papier spécial "R" et "S" désignés sur la figure n° 1. Le capillaire résulte de la soudure à travers ce papier, d'une feuille de matière plastique transparente sur une feuille de matière plastique opaque blanche qui permet une appréciation aisée des couleurs. Deux orifices "r" et "s" à l'extrémité de chaque capillaire permettent leur remplissage (voir figure n° 1).

Les microcapillaires prêts à l'emploi contiennent dans l'élément de papier "S" le substrat desséché et dans l'élément de papier "R" l'indicateur de réaction. Toutefois, dans quelques cas, ce réactif est à ajouter extemporanément au moment de la lecture. Substrats et réactifs sont en quantité parfaitement définie et rigoureusement constante.

Numérotation

Les capillaires sont rassemblés par série de DIX sur une même plaquette. Chaque capillaire porte un numéro de 0 à 9; dans l'angle inférieur gauche, chaque plaquette porte, elle aussi, un numéro correspondant à la dizaine. L'ensemble forme donc une succession de numéros allant de 00 à 62 pour soixante trois capillaires; à chacun de ces numéros correspond un substrat.

Principe de fonctionnement

Au moment de l'emploi, on remplit complètement le capillaire par l'orifice "s" avec la suspension de bactéries à étudier. L'air s'échappe par l'orifice "r", permettant un remplissage complet. Le liquide de suspension dissout le substrat et le réactif. La plaquette est laissée à plat sans agitation, le réactif diffuse lentement vers la partie "S" contenant le substrat et n'intervient que

lorsque la réaction enzymatique ou le métabolisme ont déjà commencé. Dans le cas des indicateurs de pH ou d'oxydo-réduction, il est ainsi possible d'utiliser des quantités importantes d'indicateur, donnant des colorations intenses et de lecture facile, tout en ménageant leur effet toxique et en conservant une grande sensibilité. Dans le cas où la toxicité du réactif est incompatible avec le déroulement du métabolisme, on l'ajoute après l'incubation, au moment de la lecture, par l'orifice "r".

Au moment de l'emploi, les plaquettes sont placées dans des boîtes en verre ou en matière plastique formant des chambres humides (figure n° 2). L'incubation se fait dans une étude à bactériologie ordinaire. Les plaquettes sont détruites après lecture des résultats.

Mode d'emploi

Le dispositif étant prêt à l'usage, le mode d'emploi est simple : il suffit de préparer correctement la suspension de bactéries et de l'inoculer dans chaque capillaire avec la même pipette Pasteur. Les étapes de l'identification sont les suivantes :

1 - Cultiver les bactéries sur milieu sélectif.

2 - Préparer à partir de la culture en cours de croissance, deux suspensions denses : A = une suspension dans 6 ml d'eau peptonnée à 6 ‰, pH 7,4.

B = une suspension dans 3 ml d'eau distillée.

3 - Avec la suspension A, remplir les capillaires, numéros 00 à 39 (Métabolisme des glucides).

Avec la suspension B, remplir les capillaires numéros 40 à 62 (Activités enzymatiques spécifiques).

CAPILLAIRES AUXOTAB

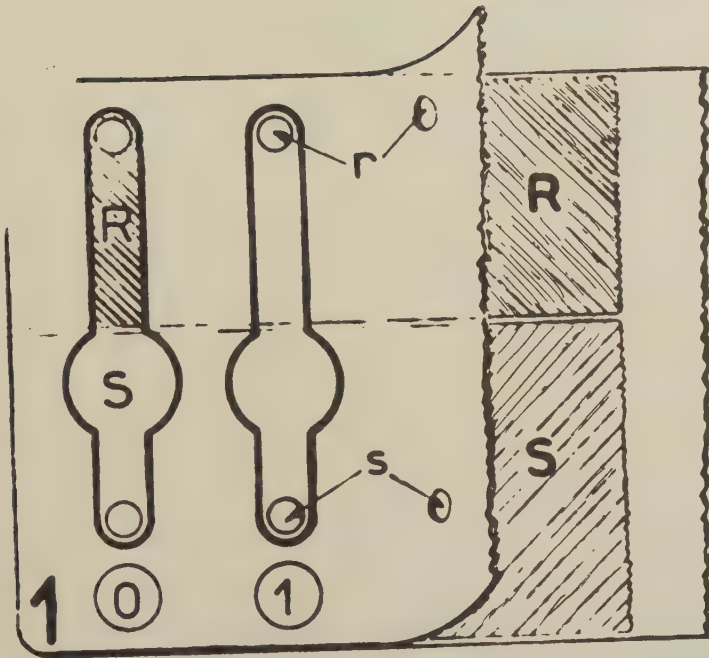


fig.1

PLAQUETTES AUXOTAB

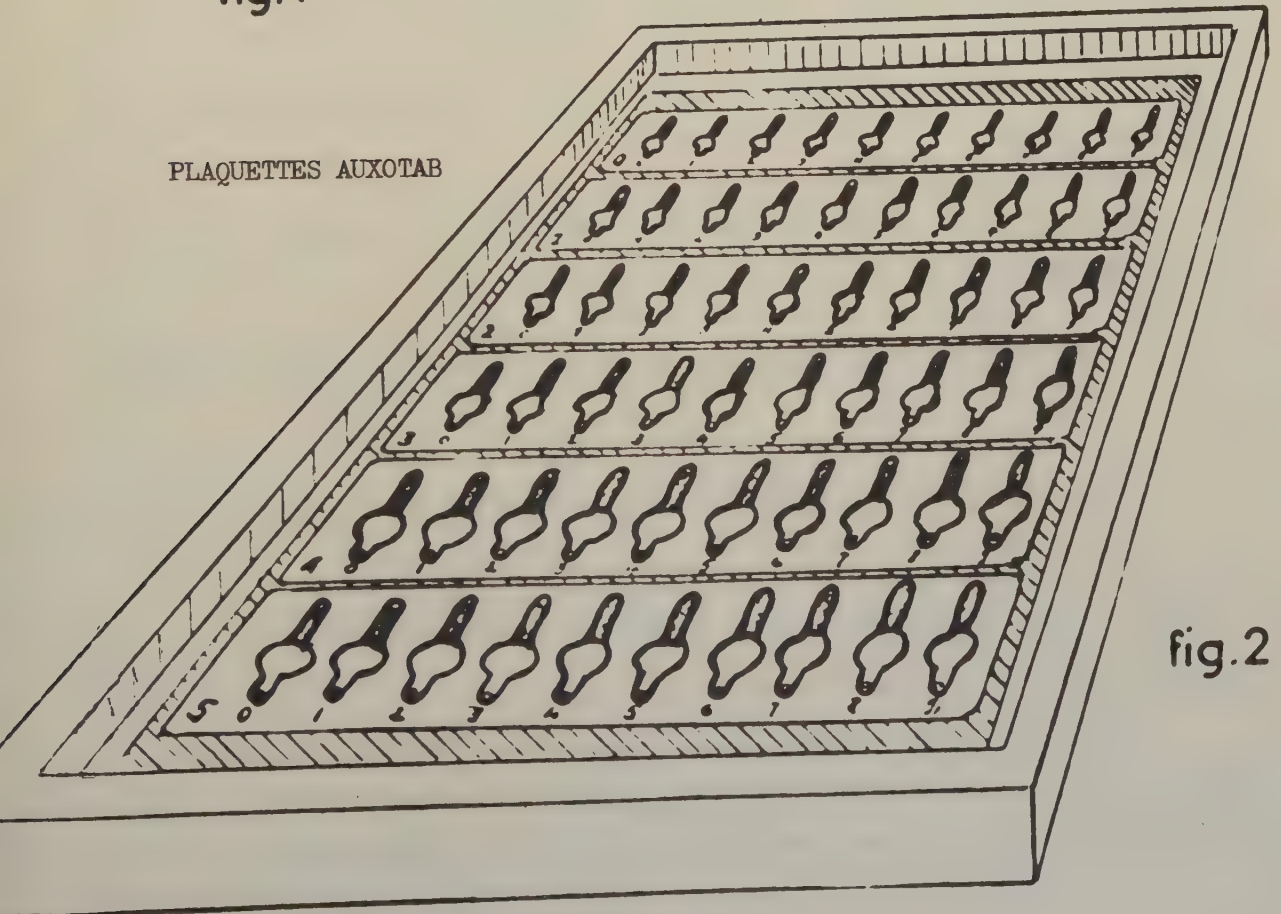


fig.2

4 - Effectuer plusieurs lectures des caractères spontanément colorés durant l'incubation, à 3 heures, à 6 heures et à 24 heures.

5 - Pour les capillaires ne contenant pas de réactif, ajouter au besoin, après l'incubation, les réactifs.

6 - Enregistrer à chaque lecture les résultats selon une notation semi-quantitative.

Cependant, les points suivant doivent être strictement respectés :

a) - La culture doit être pure.

b) - Les bactéries doivent être en phase de croissance au moment de la préparation de la suspension.

c) - Les suspensions doivent être suffisamment denses.

d) - Les milieux de suspension doivent avoir une composition et un pH bien définis.

e) - Les capillaires doivent être complètement remplis avec la même suspension.

f) - Les capillaires ne doivent pas se dessécher durant l'incubation.

Nous allons reprendre en détail quelques-uns de ces points.

1) - Les souches étudiées : leur isolement et leur culture

a) Isolement des bactéries

Les souches sont isolées, à partir de produits pathologiques, sur milieu de Chapman, pour les staphylocoques d'origine humaine et vétérinaire. Les souches qui nous ont été fournies par

l'Institut de l'Inspection des Aliments d'origine animale de Milan et par le Centre d'Etude de la Mastite bovine de Milan ont été isolées sur les milieux décrits par G. Ruffo (164).

b) Culture des bactéries sur milieu solide

Il est bien évident que l'identification n'est possible que si la culture est pure. Elle doit former un même clône, c'est-à-dire provenir d'une seule bactérie et en pratique d'une seule colonie.

Les bactéries sont cultivées en nappes sur milieu solide. Les souches de Staphylococcus et de Micrococcus n'ayant pas les mêmes exigences nutritionnelles, on utilise un milieu de culture où toutes les souches à étudier peuvent se développer et où le taux de croissance est sensiblement le même. Après des essais préalables, on a choisi le milieu Eugon-Agar, bien que ce milieu contienne du glucose. Il a été montré que les conditions optima sont observées durant la phase de croissance exponentielle.

Les Staphylococcus et la plupart des Micrococcus qui se développent rapidement sont récoltés après 18 à 24 heures d'incubation, en utilisant au besoin les cultures de plusieurs boîtes de Pétri. Les bactéries sont récoltées avec une tige de verre recourbée, afin d'éviter d'entraîner du milieu de culture.

2) - Le milieu de suspension

Par sa composition, il doit intervenir le moins possible sur l'activité enzymatique à déterminer. Il doit être stérile. On doit distinguer deux cas :

a) Si on recherche la présence d'une seule enzyme, il n'est besoin d'aucun élément nutritif; le milieu de suspension n'intervient que pour maintenir des conditions physico-chimiques optimum (pH, pouvoir tampon, présence de sels minéraux).

b) Si on étudie le métabolisme d'un substrat, des éléments énergétiques ou des vitamines peuvent être nécessaires, non pour permettre le développement des bactéries mais pour les maintenir en survie sous leur forme végétative et au besoin permettre la synthèse des enzymes du métabolisme. Ces éléments nutritifs qui font, eux aussi, l'objet d'un métabolisme, doivent être réduits au minimum et la nécessité de leur présence doit être recherchée.

Parmi les caractères étudiés, on a envisagé le métabolisme des glucides, et la manière de procéder sera exposée plus loin.

3) Mise en place du matériel

Les plaquettes doivent être placées dans des boîtes fermées, afin de maintenir une humidité suffisante et d'éviter tout risque de contamination du manipulateur par les bactéries pathogènes. Pour des études systématiques, on utilise des boîtes pouvant contenir six plaquettes de dix capillaires (figure 2).

a) On place au fond de la boîte une bande de papier buvard, recouvrant tout le fond. Cette bande est imprégnée d'eau ordinaire, à saturation.

b) On range les plaquettes, sur le papier humide, par ordre de numéro, avant de les inoculer avec la suspension de bactéries. Le papier humide empêche les plaquettes de glisser les unes sur les autres au cours du transport des boîtes en même temps qu'il contribue à saturer d'humidité l'atmosphère de la boîte. Lorsqu'une souche provenant d'un produit pathologique risque de faire courir au personnel un danger de contamination, on place, en outre, chaque plaquette dans une boîte individuelle en matière plastique, à détruire après emploi.

4) Inoculation des capillaires

Les suspensions sont prélevées avec une pipette Pasteur. La même pipette sert pour inoculer tous les capillaires. Au niveau de chaque orifice "s" des capillaires, on laisse couler le liquide de façon à remplir complètement le capillaire et on laisse, pour plus de sûreté, persister une petite goutte au niveau de l'orifice.

Il est préférable de mettre en une seule fois toute la quantité nécessaire pour remplir le capillaire, on évite ainsi la formation de bulles qui modifient les conditions d'anaérobiose.

On évitera de toucher avec la pipette le papier du capillaire, au fond de l'orifice "s", afin de ne pas transporter dans le capillaire suivant des traces de substrats. Pour la même raison, si une trop grosse quantité de milieu de suspension a été déposée à l'orifice "s", il ne faut en aucun cas la transporter sur un autre capillaire; elle sera réaspirée au besoin quand toutes les inoculations seront terminées et rejetée dans un récipient contenant un liquide antiseptique.

On peut noter, au niveau de la zone de séparation entre la bande "R" et la bande "S", un léger temps d'arrêt. Exceptionnellement le remplissage peut s'arrêter à ce niveau et la suspension ne pas diffuser dans la zone du réactif; dans ce cas, on dispose sur l'orifice "s" un léger excès, et avec le dos d'une pince on appuie sur le capillaire au niveau de la séparation pour provoquer le passage du liquide.

Avant de fermer les boîtes, il faut s'assurer que tous les capillaires sont complètement remplis et que les pH de départ sont satisfaisants.

5) Incubation

Les boîtes contenant les capillaires sont mises à l'étuve à la température de 37°C. Les meilleures conditions sont obtenues dans une étuve humide et ventilée. Si l'on ne dispose pas d'une telle étuve, mais simplement d'une étuve à air sec, non ventilée, les boîtes contenant les plaquettes sont placées dans les étages supérieurs, les unes à côté des autres. Si l'on doit ajouter des rayonnages, on les placera de façon à laisser une hauteur de dix centimètres entre chacun d'eux pour permettre une circulation d'air.

6) Destruction des plaquettes

La lecture terminée, on remplit la boîte, d'eau de Javel diluée, qu'on laisse agir une demi-heure. Les plaquettes et le papier buvard sont ensuite ramassés à la pince et jetés dans un récipient. Ils seront ensuite autoclavés ou incinérés. Les boîtes pouvant contenir six plaquettes sont soigneusement lavées à l'eau pour éliminer toute trace de produit antiseptique.

CHAPITRE V

INTERET DE L'ANALYSE MATHEMATIQUE

DANS UNE CLASSIFICATION

Toute classification repose sur le désir de rapprocher un objet d'un autre en les comparant; mais dès le départ un choix s'impose : il faut déterminer les facteurs de similitude les plus importants afin de ne pas éloigner des groupements, très proches sous de nombreux aspects, mais qui ne possèderaient pas un caractère considéré comme le chef de file de la classification à l'étude (42).

Les premières classifications en bactériologie n'ont pris en considération que les caractères morphologiques, mais ceux-ci se sont rapidement révélés insuffisants. Bien qu'actuellement les classifications reposent surtout sur des caractères biochimiques, l'étude du DNA et de la composition chimique des bactéries acquiert une grande importance. La morphologie de la paroi ectoplasmique dépend de la structure chimique qui, elle-même, est fonction du génôme (42). Or pour obtenir un changement de cette structure, il faut admettre un nombre considérable de mutations, ce qui conduit en fait à considérer la morphologie d'une bactérie comme un caractère très stable. La mise en évidence des enzymes bactériens a permis de multiplier les épreuves, augmentant ainsi l'importance de l'information, mais la qualité de cette information n'a apporté une aide efficace aux taxonomistes que lorsque la normalisation des

milieux de croissance et de réactions a vu le jour. Malgré ces essais de rationalisation, le principe des classifications n'a guère varié, car on se base généralement sur une division di-, tri-, ou polychotomique; l'importance attribuée aux différents facteurs est très subjective et l'analyse qualitative occupe souvent la place principale, ne traduisant ainsi qu'une appréciation personnelle (53).

Rompant avec la tradition, Adanson (2) a été le premier à entrevoir un rapport possible entre la géométrie et le principe des classifications. A sa suite Sneath, reprenant à son compte cette théorie, nia toute primauté, au point de vue taxonomique, d'un caractère par rapport aux autres; chaque caractère a donc une valeur égale, a priori. Chaque souche est ensuite comparée à chacune des autres souches dont on dispose et on détermine alors un coefficient de ressemblance ou de similitude "S", défini comme étant "...le rapport entre le nombre de caractères pris en considération, les caractères négatifs communs ne devant pas entrer en ligne de compte..." (177) (178).

Ce coefficient de similitude, simple à calculer avec un nombre restreint de souches, nécessite l'usage d'ordinateurs électroniques lorsque le nombre de souches s'élève au-dessus d'une dizaine (42). La méthode de Sneath a été appliquée au CRSSA, au cours d'une étude sur Streptococcus faecalis (40) (41).

Une autre possibilité de la méthode de Sneath a été envisagée par Sokal (179). Cet auteur suggère de calculer la distance entre deux souches, chacune d'entre elles étant représentée par un point d'un espace défini par des dimensions qui sont fonctions des caractères étudiés.

Parallèlement à la méthode adansonienne, s'est développée l'analyse factorielle qui permet de rechercher objectivement parmi les caractères mesurables ceux qui, se trouvant en corrélation

élevée avec d'autres caractères, apparaissent comme les plus significatifs et possèdent le coefficient de discrimination le plus élevé (42). On admet que les caractères étudiés ne sont pas indépendants, mais en corrélation entre eux, aucun n'étant cependant en soi suffisant pour caractériser un groupe dont les individus partagent en commun un nombre élevé de caractères. La méthode adansonienne peut apparaître comme une analyse factorielle de type Q, orientée sur les ressemblances des souches, aboutissant à une typologie de celles-ci et à leur groupement suivant leur degré de ressemblance globale, alors que la seconde est une analyse factorielle de type R étudiant les corrélations entre les caractères, aboutissant à une systématique des épreuves utilisées pour mettre en évidence les caractères, permettant secondairement de regrouper les souches en fonction de l'importance relative de chacun des caractères.

Ce type d'analyse factorielle a été appliqué par Defayolle et Colobert (52) à l'étude de l'espèce de Streptococcus faecalis de la façon suivante. Les résultats expérimentaux sont arrangés en une matrice de j colonnes représentant chacune un caractère et de i rangs représentant individuellement chaque souche. Le procédé choisi pour obtenir une classification à partir d'une telle matrice comporte trois étapes principales. La première n'est autre que la mesure du degré d'association dans les souches, entre les caractères pris deux à deux, c'est-à-dire la mesure dans laquelle la présence de l'un des caractères entraîne celle de l'autre. La deuxième étape est représentée par l'analyse de la matrice d'intercorrélation en utilisant le procédé de regroupement en essaims ou un procédé d'analyse multifactorielle par exemple au moyen de vecteurs latents dans un hyperespace. On définit ainsi un certain nombre de facteurs A, B, C, ... qui représentent les "facteurs dominateurs" complexes de plusieurs caractères élémentaires convenablement pondérés. La troisième étape consiste à regrouper les souches en fonction de l'importance relative de ces facteurs A, B, C,

Lorsque le nombre de ces facteurs dominateurs est réduit à trois, cela permet une représentation géométrique simple dans un espace à trois dimensions (52).

Hill et Silvestri (82) ont appliqué une méthode différente. Ils ont représenté chaque souche par un point, une surface ou un espace à n dimensions dont, dans ce dernier cas, les axes seraient orthogonaux. En ne prenant en considération qu'un caractère, la souche se trouve sur un axe, tandis qu'avec deux caractères, la position de cette souche se situera sur un plan. En choisissant trois caractères, on déterminera un volume, un cube par exemple et avec n caractères on formera un ellipsoïde. On définira la valeur des axes de cet ellipsoïde, chaque axe résultant de la combinaison de tous les caractères. En faisant varier chaque axe, l'un par rapport à l'autre, on peut calculer son importance dans l'ellipsoïde. Hill et Silvestri ont déterminé ainsi les caractères prédominants à l'intérieur de chaque groupe de bactéries.

Au cours de travaux sur Bacillus, Buissière et Colobert ont appliqué une méthode très voisine, celle d'Hotelling modifiée par Pontier, Defayolle et Poncet (53). Ces auteurs ont déterminé les axes de l'ellipsoïde "centre d'inertie" de la distribution, en se dégageant de toute contrainte gaussienne, alors que Hotelling déterminait les axes des ellipsoïdes d'égale densité de probabilité.

En se servant de la méthode Auxotab et de sa notation, on apporte dans l'analyse factorielle des variables quantitatives dont ne disposaient pas Hill et Silvestri car suivant la positivité ou la négativité de l'épreuve envisagée, ils se contentaient d'attribuer la valeur 0 ou 1 (82).

Dans la méthode d'Hotelling-Pontier, comme dans celle de Hill et Silvestri, on définit un espace à R^n dimensions, à l'aide d'axes représentant les caractères. L'ellipsoïde "centré d'inertie"

ainsi formé, possède un centre de gravité G et un nouveau système d'axes "centraux d'inertie" passant par ce point. L'axe principal est choisi de façon telle que la somme des carrés des coordonnées des N points sur cet axe soit maximum (53).

En recherchant la direction des axes "centraux d'inertie", on leur confère le rôle d'axes "facteurs" permettant d'attribuer successivement à chacun d'eux suivant leur importance, 90, 80 ou 70 % de la variance. Les axes "facteurs" sont appelés A, B, C,... Au moyen de deux axes A et B, on procède à l'établissement d'un graphique qui donne, sur un plan, la position des souches les unes par rapport aux autres, tandis qu'avec les trois axes A, B, C, on obtiendra une projection dans l'espace, projection qui facilite parfois la distinction entre des souches très voisines sur un plan.

L'application de la méthode Auxotab, couplée à la méthode d'analyse de Pontier, permet de dégager des propriétés fondamentales communes, inaccessibles à la simple lecture, par suite de l'accumulation des informations.

Il est possible de déterminer le rôle joué par chaque caractère biochimique et de donner éventuellement une interprétation physiologique. Il est également possible de dire ce qui distingue les espèces ou les réunit et de prévoir dans les espaces laissés libres par l'échantillonnage, des souches intermédiaires ou des espèces et même d'en déduire les caractères sans pour autant avoir la preuve de leur existence (53).

Deuxième Partie

TRAVAUX PERSONNELS

Dans cette deuxième partie, nous nous proposons d'une part de mettre en évidence les caractéristiques essentielles des Micrococcaceae et d'autre part de rechercher chez ces derniers les preuves d'un pouvoir pathogène; dans ce but nous utiliserons la méthode Auxotab dont la caractéristique est une meilleure normalisation des épreuves. En effet on n'utilisera que des substrats parfaitement connus, qualitativement et quantitativement. Les bactéries n'interviennent que comme sources d'enzymes; c'est pourquoi elles sont employées à l'état non proliférant. Le temps, la durée d'incubation et la lecture des résultats sont parfaitement définis. Le but de ces précautions est d'éliminer toute subjectivité afin d'obtenir des résultats parfaitement reproductibles et utilisables en vue d'une analyse classique ou mathématique. Conformément à Sneath et Sokal (178) (179) qui préconisaient l'utilisation d'au moins quarante caractères pour procéder à une analyse valable, nous avons limité notre choix à l'étude de soixante deux caractères, choisis parmi des métabolismes différents. Il est à noter que ce choix n'est pas limitatif, mais on peut penser qu'à partir d'un certain degré, l'addition d'épreuves nouvelles n'apporte plus qu'un gain d'information minime ou négligeable.

Afin de comparer notre méthode à celles jusqu'ici employées, nous travaillerons sur un souchier de référence dont on connaît un grand nombre de données; ensuite nous étudierons des souches de provenance diverse.

Une fois nos résultats obtenus, nous procéderons à deux opérations. La première consiste à une analyse dichotomique des résultats, en choisissant au départ les caractères considérés les plus représentatifs de la famille des Micrococcaceae. La deuxième opération sera le traitement des résultats par l'analyse factorielle au moyen d'un ordinateur. Le but recherché est de connaître la

position de chaque souche par rapport aux autres souches en fonction des différentes épreuves, ce que l'on matérialisera au moyen d'un graphique. Nous comparerons les résultats de notre classement avec les classifications actuelles et nous verrons si Staphylococcus aureus correspond à une réalité et s'il se distingue facilement des espèces voisines. Nous rechercherons en même temps s'il existe une relation entre le pouvoir pathogène et la position d'une souche, sachant que les coordonnées de cette dernière ne sont que l'expression d'un ensemble de caractères.

CHAPITRE I

METHODES D'ETUDES

A - UTILISATION DES GLUCIDES

Capillaires 00 à 39

Chaque glucide est contenu à l'état sec et en quantité rigoureusement constante dans la portion "S", restée blanche, du capillaire. A l'intérieur du faible volume du capillaire une suspension de bactéries vivantes, aéro-anaérobies, crée rapidement des conditions d'anaérobiose, nécessaire à l'observation d'un métabolisme fermentatif.

Dans la majorité des cas, on recherche la formation d'acides à partir des glucides. Dans la partie centrale du capillaire au niveau du renflement qui est la zone d'anaérobiose, cette modification correspond à ce que l'on appelle habituellement la fermentation. Au niveau de l'orifice "s" et de la petite goutte d'excès de suspension, l'acidification correspond à un métabolisme en aérobie.

Pour mesurer ces modifications, le réactif employé est un indicateur de pH. Dans la série de capillaires AUXOTAB-R, le rouge de phénol a été choisi parce qu'il donne une grande sensibilité dans la zone de neutralité (rouge vif à un pH de 7,5; jaune au-dessous d'un pH de 6,8).

LECTURE

SUBSTRATS	Réaction positive	Réaction négative
00 - Témoïn	rouge vif	rouge
1 - Glycérol	jaune	rouge
2 - Erythritol	jaune	rouge
3 - D-Arabinose	jaune	rouge
4 - L-Arabinose	jaune	rouge
5 - Ribose	jaune	rouge
6 - D-Xylose	jaune	rouge
7 - L-Xylose	jaune	rouge
8 - Adonitol	jaune	rouge
9 - Galactose	jaune	rouge
10 - Glucose	jaune	rouge
1 - Fructose	jaune	rouge
2 - Mannose	jaune	rouge
3 - Sorbose	jaune	rouge
4 - Rhamnose	jaune	rouge
5 - Dulcitol	jaune	rouge
6 - Inositol	jaune	rouge
7 - Mannitol	jaune	rouge
8 - Sorbitol	jaune	rouge
9 - Glucosamine	jaune	rouge
20 - Methyl-mannoside	jaune	rouge
1 - Methyl-glucoside	jaune	rouge
2 - N-acétyl-glucosamine	jaune	rouge
3 - Amygdaline	jaune	rouge
4 - Arbutine	jaune	rouge
5 - Esculine	noire	blanc
6 - Salicine	jaune	rouge
7 - Cellobiose	jaune	rouge
8 - Maltose	jaune	rouge
9 - Lactose	jaune	rouge
30 - Mélibiose	jaune	rouge
1 - Saccharose	jaune	rouge
2 - Tréhalose	jaune	rouge
3 - Inuline	jaune	rouge
4 - Mélézitose	jaune	rouge
5 - Raffinose	jaune	rouge
6 - Dextrine	jaune	rouge
7 - Amylose	jaune	rouge
8 - Amidon	jaune	rouge
9 - Glycogène	jaune	rouge

TABEAU N° 3

On notera :

- une acidification observée avec le caractère N-acétyl-glucosamine par production d'acide acétique, peut être le fait d'une seule enzyme, une acétylase, et non le résultat d'un métabolisme fermentatif du glucose.

- dans le cas des hétérosides, l'hydrolyse de l'Esculine est recherchée en utilisant le citrate de fer selon la méthode habituelle, ce réactif étant imprégné dans l'élément "R" du dispositif.

L'hydrolyse de l'arbutine (N° 24) est recherchée à la fois par l'acidification avec le rouge de phénol et par la réduction du citrate de fer.

L'hydrolyse de l'Amygdaline (N° 25) est recherchée par la simple acidification.

Détermination des conditions optimum :

1 - Influence des conditions de culture

a) Influence du temps de culture

Les bactéries sont cultivées pendant 16, 24, 48 et 72 heures sur milieu gélosé. Les conditions optimum sont observées après 16 à 24 heures d'incubation. Après 24 heures, les acidifications sont retardées, et leur spectre modifié.

b) Influence des glucides contenus dans le milieu de culture.

Si des glucides provenant du milieu de culture sont contenus dans la suspension qui sert à inoculer les capillaires, toute lecture est rendue impossible. Dans le cas des staphylocoques, le glucose et éventuellement le lactose sont fermentés et entraînent

très rapidement une acidification dans tous les capillaires, y compris le témoin 00. Par contre si le milieu de suspension n'en contient plus, la présence de glucose dans la composition du milieu de culture a peu d'influence sur le spectre des résultats à condition que le milieu de culture possède par ailleurs tous les éléments nutritifs nécessaires à un développement abondant de la souche.

Une fois les bactéries récoltées à l'anse sur milieu solide, on place les suspensions au bain-marie 15 à 20 minutes à 37° C, avant de les inoculer dans les capillaires.

2 - Influence du nombre de bactéries dans la suspension

Pour l'étude de l'acidification des glucides, la suspension doit provoquer une opacité appréciable (environ 5.10^8 bactéries par millilitre). Cette opacité doit être mesurée au photomètre afin de rendre les résultats comparables si l'on étudie les caractères distinctifs d'espèces voisines. Mais, en pratique, on peut prendre comme référence une opacité étalon, dont le type est la suspension antigénique 0 pour le sérodiagnostic des salmonelloses, par exemple.

On n'observe pas de modifications notables dans la vitesse ou l'intensité enzymatique si la suspension varie entre 5.10^8 et 5.10^9 bactéries par millilitre. Quand la suspension ne contient que 10^8 bactéries par millilitre, les premières acidifications ont un délai d'apparition plus long, tandis que celles qui apparaissent tardivement avec des densités bactériennes plus élevées, sont peu modifiées. Pour des densités de 10^4 à 10^5 bactéries par millilitre, on observe un écrasement des différences, et entre 10 et 18 heures d'incubation, tous les glucides sont presque fermentés en même temps. En utilisant des suspensions très denses dont la concentration atteint 10^9 bactéries par millilitre, les glucides qui doivent être les premiers acidifiés, le sont plus précocement, en quelques minutes, tandis que la vitesse d'acidification des glucides qui appa-

raissent secondairement n'est pas modifiée dans les mêmes proportions. L'allure générale du spectre reste malgré tout sensiblement la même.

3 - Influence de la concentration des glucides

Les traces d'impureté augmentant avec la concentration des glucides, on doit s'assurer de la pureté de ces derniers. Pour les glucides solubles facilement dans l'eau, les résultats obtenus avec des capillaires imprégnés de solutions variant entre 5 et 15 % sont superposables (c'est-à-dire avec des concentrations finales de 0,5 à 1,5 % dans les capillaires inoculés avec la suspension de bactéries). Avec les glucides plus faiblement solubles, ou les polysides et hétérosides ne donnant pas de solutions vraies (amylose, amidon, glycogène...) et avec les bactéries qui acidifient ces glucides, les courbes ne sont pas sensiblement modifiées si les concentrations finales dans les capillaires varient entre 0,01 et 0,5 %. Avec Staphylococcus aureus, dans les mêmes conditions expérimentales et à densité optique égale le mannitol est toujours tardivement acidifié par rapport au glucose quelle que soit la concentration.

4 - Influence du milieu de suspension

Il joue un rôle important et les variations obtenues en modifiant sa composition constituent une information supplémentaire dans la taxonomie. En principe il doit intervenir le moins possible sur l'activité enzymatique ou le métabolisme à déterminer.

Si on étudie le métabolisme d'un substrat, des éléments énergétiques peuvent être nécessaires, non pour permettre le développement des bactéries, mais pour les maintenir en survie sous leur forme végétative et au besoin pour permettre la synthèse des enzymes du métabolisme. Ces éléments nutritifs qui font eux aussi

l'objet d'un métabolisme doivent être réduits au minimum et la nécessité de leur présence doit être recherchée.

Provenant du même milieu de culture, les suspensions de même densité de staphylocoques en milieu peptomé et en eau distillée ne possèdent pas un même spectre d'acidification. Dans l'eau distillée, le milieu de Hanks ou dans un tampon phosphaté, les premières acidifications sont obtenues plus rapidement qu'en milieu peptonné, mais des glucides fermentés plus lentement, mais constamment, dans l'eau peptonnée n'apparaissent pas toujours acidifiés dans l'eau distillée. Aussi avons-nous choisi un milieu nutritif contenant

peptone 6 g

eau distillée 1000 ml

En vue d'une normalisation, nous avons utilisé toujours la même peptone ("Trypticase BD" Mérieux). Après sa préparation ce milieu est stérilisé à l'autoclave.

Il est essentiel que le pH de ce milieu de suspension se situe entre 7,3 et 7,5 au moment de son emploi, donc après la stérilisation.

Un liquide de suspension trop acide, ou même à pH 7,0 fait virer au jaune-orange l'indicateur contenu dans chaque capillaire et rend la lecture des réactions difficile. A l'inverse un milieu trop alcalin provoque des retards d'acidification qui font perdre une grande partie de la précision des lectures. La préparation d'un tel milieu ne présente aucune difficulté. Si l'on ne dispose pas d'un pH-mètre, il existe des papiers indicateurs suffisamment précis pour estimer un pH voisin de 7,4.

Inoculation des capillaires

Dès que les suspensions sont prêtes, elles sont réparties immédiatement dans les capillaires. On commence par inoculer le capillaire 00. Si le pH de la suspension est bien voisin de 7,4, celle-ci en dissolvant le rouge de phénol fait apparaître une teinte rouge-vif. Si la teinte vire au jaune ou au pourpre, le pH de la suspension n'a pas été correctement ajusté et il est inutile de continuer l'inoculation.

Le capillaire 00 ne contenant aucun glucide mais uniquement l'indicateur de pH, la teinte rouge doit se maintenir tout au long de l'expérience et servira de témoin négatif; elle est celle de l'absence d'une acidification et se lit 0.

Lecture de l'acidification

A mesure que l'indicateur de pH diffuse de l'élément "R" vers l'élément "S", il se forme une frange où les concentrations d'indicateur sont très faibles et c'est à ce niveau qu'apparaît le plus précocement le virage.

Si le pH ne change pas, cette zone de diffusion reste rouge. Si une acidification se produit, cette frange prend une teinte jaune qui s'accroît et finalement tout l'indicateur contenu dans le capillaire vire au jaune d'or.

Entre un pH de 7,5 et un pH de 6,6, le changement de teinte du rouge de phénol est une mesure de la quantité d'acide formé, et peut être apprécié par une notation semi-quantitative.

		Note
pH 7,4	: aucune acidification	0
pH 7,2	: début d'acidification (douteux faible)	1
pH 7,0	: douteux positif	2
pH 6,8	: positif faible, mais incontestable	3
pH 6,6	: positif	4
pH inf. à 6,4	: acidification complète	5

Lecture des résultats au densitomètre

Les changements de teinte de l'indicateur de pH sont enregistrés par le densitomètre CHROMOSCAN (JOYCE) en lumière réfléchie. La zone de virage du rouge de phénol se situe entre pH 7,5 et 6,5. Avec un filtre de 5200 Å, l'absorption est maximum dans le rouge, c'est-à-dire dans le cas d'une absence d'acidification, et minimum dans le jaune, c'est-à-dire dans le cas d'une acidification à un pH égal ou inférieur à 6,0. Pour saisir les moindres variations de pH dans la zone de virage, l'appareil est réglé de sorte que l'étalement soit maximum entre pH 7,4 et 6,4. On laisse défiler automatiquement les plaquettes devant la tête de lecture (voir Figure n° 3).

Le but de cette lecture est de détecter une cinétique de l'acidification. On constate qu'avec une même suspension, les glucides ne sont pas tous acidifiés avec la même rapidité. Certains le sont précocement; d'autres tardivement. On observe que, pour les bactéries de la même souche, ces différences de cinétique sont reproductibles et sont caractéristiques d'une famille, d'une espèce ou d'un chimiotype.

Deux espèces acidifiant les mêmes glucides peuvent être distinguées parce qu'elles n'acidifient pas un ou plusieurs glucides à la même vitesse. La notation de cette cinétique apporte donc beaucoup plus d'information que la simple lecture finale, en positif ou négatif.

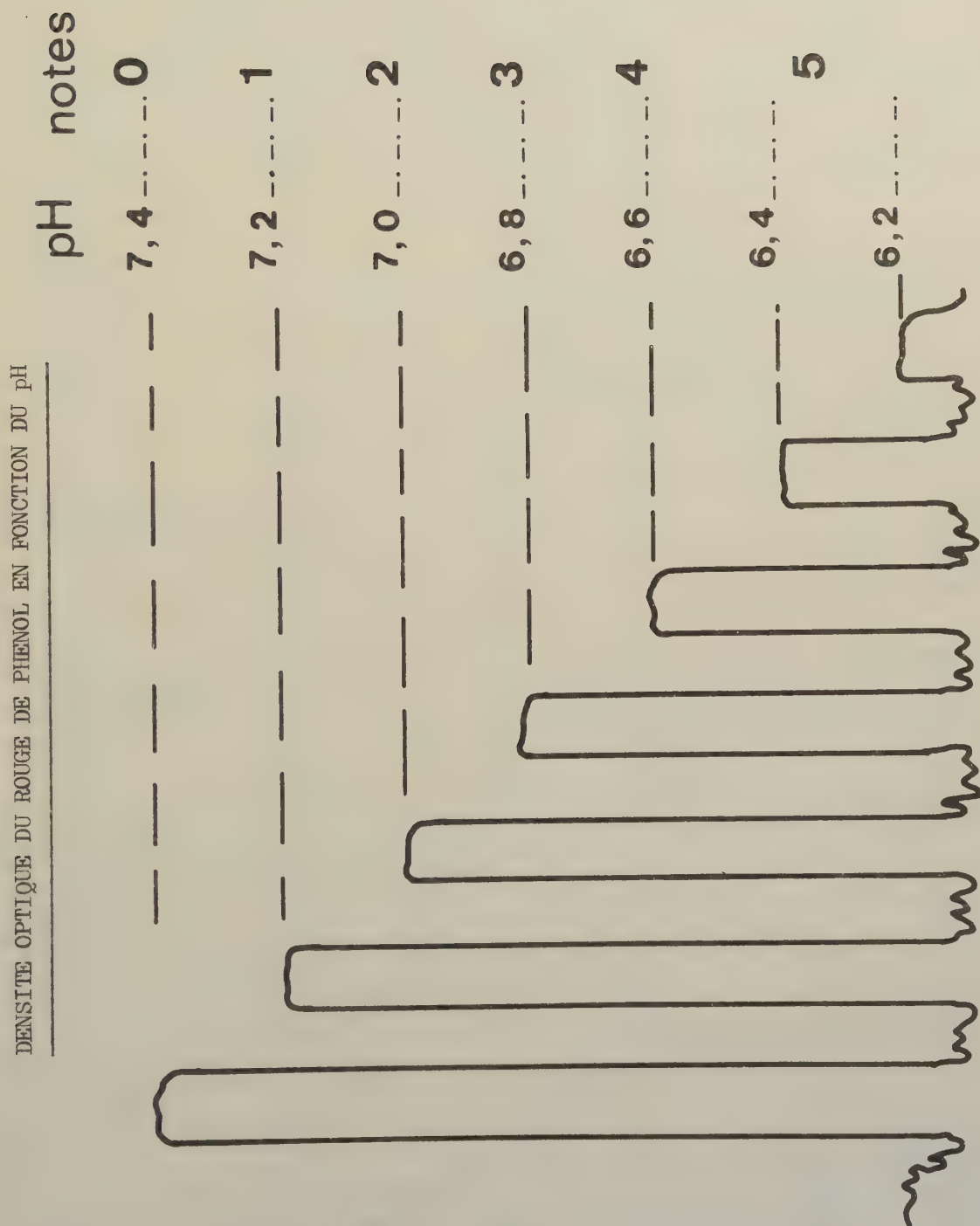
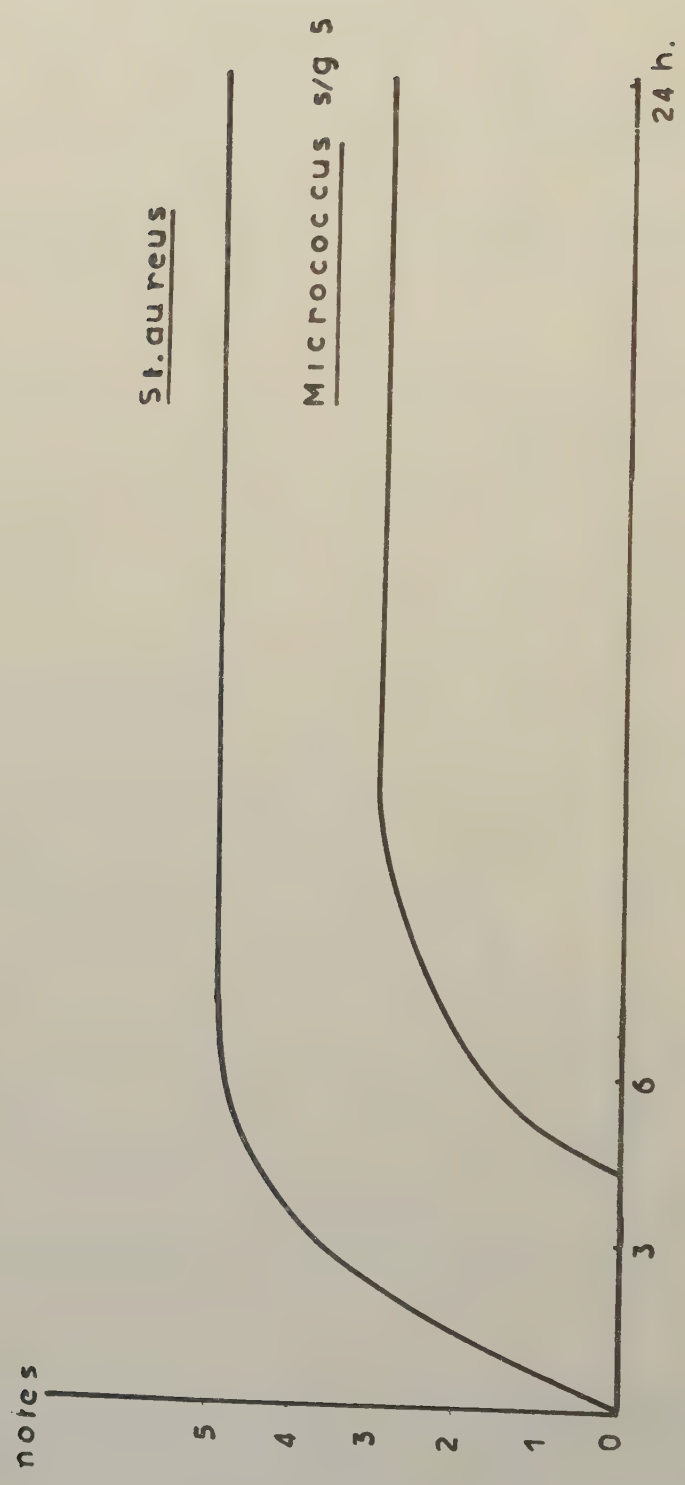


FIGURE N° 3



COURBE D'ACIDIFICATION DU GLUCOSE

FIGURE N° 4

On voit ainsi que l'acidification du glucose après un délai de 24 heures, est franchement positive, à la fois pour Staphylococcus aureus et pour Micrococcus sous-groupe 5 de Baird-Parker. Mais les lectures après 3 heures, 6 heures et 24 heures, mettent en évidence une cinétique différente dans les deux cas (Fig. n° 4).

Exemple de cinétique d'acidification des glucides

		N° des capillaires											
	Délai	1	5	9	10	11	12	18	22	28	29	31	32
<u>Staphylococcus aureus</u>	3 h.	0	1	3	4	5	4	0	3	2	0	3	3
	6 h.	2	2	5	5	5	5	2	4	3	2	4	4
	24 h.	3	3	5	5	5	5	3	5	4	5	5	5
<u>Micrococcus</u> sous-groupe 5	3 h.	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	6 h.	1	1	3	1	2	0	1	2	2	0	1	2
	24 h.	2	3	5	3	3	0	2	3	3	2	3	3

Les capillaires dont les numéros ne figurent pas sur ce tableau, donnent des résultats négatifs.

Le dispositif AUXOTAB, parce qu'il est disposé à plat dans des boîtes transparentes, est justement prévu pour rendre facile et très rapide ce genre de lecture si l'on dispose, pour enregistrer les résultats, d'une fiche modèle ci-joint (voir tableau n° 4).

Pour le caractère Esculine, au lieu de lire un changement de coloration, on lit l'apparition d'un noircissement dont l'intensité peut être lue dans le temps, de la même manière, par des notes de 0 à 5. De même, pour le caractère Arbutine, on lit un noircissement en aérobiose et une acidification dans le renflement

du capillaire. La formation de bulles que l'on voit très bien avec un éclairage rasant, indique que l'acidification s'accompagne d'une production de gaz.

Enregistrement des résultats

Sur la fiche, on établit un diagramme en soulignant les notes 3 et supérieures à 3, c'est-à-dire les caractères incontestablement positifs. L'aspect général de ce diagramme est caractéristique de la souche; il peut être enregistré sur carte perforée ou codé en vue d'un traitement mathématique sur ordinateur.

Code pour l'ordinateur

On attribue une valeur-code aux résultats, suivant l'intensité et la rapidité des métabolismes.

Ainsi aux notes 4-5 lues à la 3e heure correspond la valeur-code 5

"	"	"	"	6e	"	"	"	4
"	"	3-4-5	"	24e	"	"	"	3
"	"	1-2		24e	"	"	"	2
"	"	0		24e	"	"	"	1

B - UTILISATION DE SUBSTRATS DIVERS, AUTRES QUE LES GLUCIDES

Capillaires 40 à 49

Les substrats synthétiques sont des composés qui ne peuvent être dégradés spécifiquement que sous l'action de l'enzyme. Seuls ceux dont la dégradation libère un produit spontanément coloré, ou colorable par un réactif, sont utilisés.

Les substrats

Parmi les substrats synthétisés ces dernières années, on a retenu dix d'entre eux parce que cinq explorent une activité estérasique superposable à la lipidolyse, quatre montrent des activités endoprotéinasiques de type trypsine et exoprotéinasiques de type aminopeptidase. On leur a ajouté le substrat déjà bien connu de la phosphatase (32).

Les substrats sont contenus à l'état sec dans la partie "S" de chaque capillaire. Certains d'entre eux, insolubles dans l'eau, sont imprégnés en solution dans des solvants organiques. Après évaporation, le substrat forme un très fin précipité fixé sur les fibres du papier; cette dispersion est un facteur de sensibilité de la méthode.

En raison de leur importance dans la classification des cocci Gram positif, l'imprégnation des capillaires avec des substrats D-L-alanyl- β -naphtylamide et L-leucyl- β -naphtylamide doit être pratiquée de manière rigoureuse : on part d'une solution mère dans l'acétone que l'on dilue dans l'alcool méthylique au moment de l'emploi. On imprègne les capillaires avec 0,30 μ l ce qui correspond à 30 μ g de substrat par capillaire.

Les plaquettes sont ensuite séchées et conservées à + 4° C.

Milieu de suspension

Les bactéries vivantes sont mises en suspension dans de l'eau distillée. Les capillaires ont été préparés à cet effet : en même temps que des quantités constantes de substrats les sels minéraux et les tampons sont contenus dans la partie "S" du capillaire.

Incubation

Si les réactifs sont incompatibles avec le déroulement de l'activité enzymatique, ils sont ajoutés après l'incubation, lorsque la lecture du métabolisme des glucides est terminée, soit en général après 24 heures d'incubation.

Toutefois si le métabolisme des glucides est lu après 6 heures d'incubation et que l'on juge ce délai suffisant pour faire apparaître toutes les acidifications, on ajoute alors les réactifs dans les plaquettes 4 et 5. Cependant il y a lieu de vérifier qu'une lecture après 24 heures d'incubation n'apporterait pas d'informations supplémentaires; pour cela, on inocule deux plaquettes 4 et deux plaquettes 5. Une plaquette de chaque série est révélée après 6 heures et l'autre après 24 heures d'incubation.

Réactifs

Pour la plaquette 4, on emploie deux réactifs :

- NaOH N/10

- Une solution de Diazo-bleu-B au 1/1500. Cette solution est préparée extemporanément en dissolvant 1 cg de Diazo-bleu-B (Di-ortho-anisidine-tétra-azotée) dans 15 ml d'eau distillée à 0°C. Au moment de la lecture on laisse tomber une goutte de réactif sur l'orifice

"r"

Réactions témoins négatifs

On fait, une fois pour toutes, une réaction témoin-négatif afin d'observer les teintes dues aux réactifs et de vérifier la bonne conservation d'un lot de plaquettes. On remplit d'eau distillée stérile les plaquettes 4 et 5, on les met à incuber en même temps que les plaquettes inoculées avec la suspension bactérienne. Après l'incubation, on ajoute les réactifs, les teintes obtenues sont celles des réactions négatives et sont lues 0.

Lectures des réactions (voir tableau n° 5)

- Caractère 40 : on ajoute par l'orifice "r" 1 goutte de NaOH N/10; si les bactéries possèdent une phosphatase, une coloration rouge intense due à la phénolphthaléine libérée apparaît immédiatement. Selon l'intensité de la teinte, entre le rose et le rouge-cerise, on notera les positivités selon la notation 1-2-3-4-5.

- Caractères 41-42-43-44-45 : on ajoute par l'orifice une goutte de Diazo-bleu-B. Si les bactéries possèdent une activité estérasique correspondant à ces substrats, une teinte violette apparaît. Cette teinte doit être lue dans les quelques dizaines de secondes qui suivent l'addition du réactif, car elle a tendance à s'estomper et à virer au brun. Selon son intensité, elle sera lue semi-quantitativement 1-2-3-4-5. La réaction négative est jaune-pâle, c'est la teinte du réactif.

- Caractères 46 et 47 : on ajoute 1 goutte de Diazo-bleu-B. Si les bactéries possèdent une aminopeptidase, il apparaît une teinte violette qui vire au rouge en une trentaine de secondes. On lit les intensités et la réaction comme pour les caractères 41 à 45.

SUBSTRATS SYNTHETIQUES

<u>Substrats</u>	<u>Produit colorable</u>	<u>Réactif</u>	<u>Réaction -</u>	<u>Réaction +</u>
PHOSPHATASES				
40 phénolphtaléine diphosphate	phénolphtaléine	NaOH N/10	incolore	rouge
ESTERASES				
41- β -naphtyl acétate	β naphtol	diazo-bleu	jaune	violet
42- β -naphtyl laurate	β naphtol	diazo-bleu	jaune	violet
43- β -naphtyl palmitate	β naphtol	diazo-bleu	jaune	violet
44- β -naphtyl stéarate	β naphtol	diazo-bleu	jaune	violet
45- β -naphtyl nonanoate	β naphtol	diazo-bleu	jaune	violet
AMINOPEPTIDASE				
46-DL-alanyl β naphtylamide	β naphtylamide	diazo-bleu	jaune	rouge
47-L-leucyl β naphtylamide	β naphtylamide	diazo-bleu	jaune	rouge
TRYPSINE				
48-N-benzoyl DL-arginine β naphtylamide	β naphtylamide	diazo-bleu	jaune	violet
CHYMOTRYPSINE				
49-N-benzoyl-DL-phényl- alanine- β -naphtyl ester	β naphtol	diazo-bleu	jaune	violet

TABEAU N° 5

- Caractères 48 et 49 : on ajoute par l'orifice "r" 1 goutte de Diazo-bleu-B. Si la bactérie possède des enzymes actifs sur les substrats de la trypsine et de la chymotrypsine, une teinte violette apparaît. La lecture se fait comme pour les caractères 41 à 45.

Capillaires 50 à 62 (voir Tableau n° 6).

L'inoculation des capillaires se fait avec une suspension de bactéries, dans l'eau distillée, comme pour la plaquette 4.

- Caractère 50 : recherche de la bêta-galactosidase, l'ortho-nitro-phényl-galactopyranoside (ONPG) et un inducteur synthétique de cette enzyme (IPTG). Le produit de dégradation coloré est l'ortho-nitro-phénol qui est naturellement jaune. Si la culture de la bactérie s'est développée sur un milieu contenant du lactose la bêta-galactosidase est induite; on fait tomber dans l'orifice "s" 1 goutte de toluène et on remplit ensuite complètement le capillaire avec la suspension de bactéries. Si la lecture provient d'un milieu non lactosé on remplit le capillaire avec la suspension de bactéries sans laisser d'excès dans l'orifice "s".

Après 3 heures d'incubation, lors de la première lecture du métabolisme des glucides, on ajoute une petite goutte de toluène par l'orifice "s"; les résultats seront lus au cours des lectures ultérieures.

- réaction positive : jaune
- réaction négative : absence de coloration.

- Caractère 51 : recherche d'une uréase

Le capillaire ne contient que l'urée et un tampon phosphaté pH 5,5. La dégradation de l'urée sous l'effet d'une uréase provoque une alcalinisation qui est recherchée par le virage du rouge de phénol.

- réaction positive : rouge
- réaction négative : jaune

- Caractère 52 : recherche de la désamination du tryptophanne

Ce capillaire comprend du tryptophanne et un tampon phosphate. Lors de la dernière lecture du métabolisme des glucides, on dépose 1 goutte de solution de perchlorure de fer officinal (à 26%) diluée au 1/3 dans l'eau distillée, sur l'orifice "r".

- réaction positive : coloration rouge-brun
- réaction négative : coloration jaune (teinte propre au réactif)

- Caractère 53 : recherche de la désamination de la phényl-alanine en milieu tamponné (tampon phosphaté pH 5,5).

On procède comme pour le caractère 52.

- réaction positive : coloration verte
- réaction négative : coloration jaune

- Caractère 54 : recherche de la formation d'indole à partir du tryptophanne.

Lors de la dernière lecture du métabolisme des glucides, on dépose sur l'orifice "r" une goutte du réactif de Kovacs.

- réaction positive : coloration rouge
- réaction négative : coloration jaune (teinte propre du réactif).

- Caractère 55 : recherche de la réduction du nitrate de potassium en nitrite (en milieu glucosé).

Lors de la dernière lecture du métabolisme des glucides, on dépose sur l'orifice 1 goutte des deux réactifs suivants :

- réactif A acide sulfanilique 0,8 g.
 acide acétique 5 N 100 ml

- réactif B alpha naphtylamine 0,5 g
- acide acétique 100 ml
- réaction positive : coloration rouge
- réaction négative : coloration jaune (teinte propre du réactif).

La concentration importante du nitrate de potassium rend peu probable la réduction complète des nitrates en nitrites et des nitrites en azote. Cependant on peut vérifier, si la réaction est négative, que les nitrates ne sont pas réduits en ajoutant par l'orifice "s" quelques grains de limaille de zinc. Une teinte rouge apparaît s'il restait du nitrate de potassium.

- Caractère 56 : réduction du tellurite de potassium (en milieu glucosé).

La réduction du tellurite de potassium s'accompagne d'un noircissement, qui peut être noté selon son intensité 1-2-3-4-5. En l'absence de réduction, le capillaire reste blanc.

- Caractère 57 : réduction de la résazurine (en milieu glucosé).

Cette réduction s'accompagne d'un changement de teinte, du bleu à l'incolore en passant par le rouge. La résazurine est pratiquement toujours réduite par des suspensions denses des bactéries vivantes. A ce titre, sa réduction est une preuve de la survie des bactéries et montre que la suspension a été correctement préparée.

- Caractère 58 : réduction du chlorure de triphényl-tétrazolium (TTC) en milieu glucosé.

Cette réduction s'accompagne de l'apparition d'une teinte rouge-brique. En l'absence de réduction le capillaire reste incolore.

- Caractère 59 : réduction du bleu de tétrazolium (BT).

Les réductions du TTC et du BT doivent être lues parallèlement au métabolisme des glucides 1-2-3-4-5.

Recommandations concernant la plaquette 5

Les réactifs contenant des produits volatils acides, le réactif de Kovaos, le réactif des nitrites, ne seront ajoutés qu'en dernier lieu, quand toutes les réactions à coloration spontanée auront été lues et enregistrées. Ces produits volatils feraient virer tous les indicateurs de pH des autres réactions contenus dans la même boîte.

Les caractères 50-51-52-53-54-55 donnent des réactions du type "tout ou rien"; aussi une notation semi-quantitative n'est-elle pas justifiée. Cependant, pour conserver l'homogénéité des résultats, on note les réactions positives 5 et les réactions négatives 0.

- Caractère 60 : recherche de la décarboxylation de l'arginine.

Cette technique est une adaptation de celle décrite par Mortensen et Kocur (122).

20 microlitres du milieu suivant :

K_2HPO_4	M/15	10 ml
$K H_2P O_4$	M/15	90 ml
monochlorhydrate de (L+) arginine		5 g
pourpre de bromocrésol à 2 ‰		0,5 ml
rouge de crésol à 2 ‰		0,25 ml

sont inoculés dans les capillaires, qui sont ensuite séchés. On remplit le capillaire avec une suspension bactérienne préparée dans l'eau distillée comme précédemment. Par décarboxylation de l'arginine, la fonction amine libérée fait virer l'indicateur au violet.

SUBSTRATS SYNTHETIQUES

<u>Substrats</u>	<u>Produit colorable</u>	<u>Réactif</u>	<u>Réaction -</u>	<u>Réaction -</u>
50 - ONPG	ortho-nitrophénol	néant	jaune	incoloré
51 - urée	carbonate d'ammonium	néant	rouge	jaune
52 - tryptophanne	ac. indolepyruvique	FeCl ₃ off. au 1/3	rouge-brun	jaune
53 - phénylalanine	ac. phénylpyruvique	FeCl ₃ off. au 1/3	vert	jaune..
54 - tryptophanne	indole	R. Kovacs	rouge	jaune
55 - nitrate de potassium	nitrite	ac. sulfanilique α naphtylamine	rouge	jaune
56 - tellurite de potassium		néant	noire	incoloré
57 - résazurine		néant	rouge puis incoloré	bleu
58 - TTC		néant	vieux rose	incoloré
59 - BT		néant	bleu	incoloré
60 - arginine	amine	néant	gris-vert	violet
61 - pyruvate de sodium	acétoïne	potasse créatine α naphtol	incoloré	rouge
62 - para-nitro-phénylphosphate	para-nitrophénol	néant	jaune	incoloré

TABLEAU N° 6

- Caractère 61 : recherche de la formation d'acétoïne à partir du pyruvate de sodium.

La suspension bactérienne, pour ce caractère ainsi que pour le suivant, se prépare dans l'eau distillée.

La révélation se fait par 1 goutte de potasse à 40 %

1 goutte de créatine à 1 %

1 goutte de solution alcoolique
d'alpha-naphtol à 1 %

ajoutées à l'orifice "r" du capillaire. Une réaction positive fait apparaître une coloration rouge.

- Caractère 62 : recherche d'une phosphatase par le para-nitrophényl-phosphate.

Les phosphatases libèrent le para-nitrophénol, de couleur jaune naturellement. Ce substrat permet de mieux suivre la cinétique de l'activité enzymatique.

En dehors de ces résultats obtenus par la méthode AUXOTAB, nous avons étudié nos souches par les techniques classiques.

Certains résultats comme la présence de coagulase, de lipase et le lysotype, nous ont été communiqués en même temps que les souches. Par contre, afin de suivre la classification de Baird-Parker, nous avons exploré la fermentation et l'oxydation du glucose avec le milieu international de 1965.

Ce milieu semi-liquide comprend :

tryptone (Difco)	1,0 g
extrait de levure (Difco)	0,1 g
glucose	1,0 g
pourpre de bromocrésol	0,004 g
agar (Difco)	0,2 g
eau distillée	100 ml

Ajuster à pH 7,2. Répartir en tube de 16 mm de diamètre. Après régénération du milieu par chauffage et refroidissement dans la glace fondante, deux tubes sont largementensemencés par piquûre jusqu'au fond. L'un des deux tubes est recouvert de 2 cm de paraf-fine stérile. L'incubation est faite à 37°C. Les acidifications sont lues chaque jour jusqu'au cinquième jour.

C - MISE EN EVIDENCE, PAR LE MOYEN DE BACILLUS ALVEI, DE LA
PRODUCTION DE LYSOZYME

Faisant suite à une étude sur Bacillus alvei (30), nous avons été amenés à observer sur gélose le développement ou la lyse de nombreuses souches de staphylocoques et de microcoques, en présence de ce germe.

Bacillus alvei, prélevé chez les larves d'abeilles atteintes de la loque européenne, est une bactérie lysogène qui donne des colonies "mobiles" extensives, quand elle est cultivée à la surface d'une gélose nutritive. Quand cette bactérie est cultivée dans la profondeur de la gélose, donc en anaérobiose relative et à la température de 37° C, il se produit un phénomène d'inhibition de sa croissance en surface. Ce pouvoir inhibiteur des cultures en profondeur peut être cependant levé si l'on fait diffuser de la N-acétylglucosamine dans la gélose (par exemple, en déposant à la surface, un disque de papier imprégné de ce glucide) on constate alors qu'au voisinage de ce disque, toutes les espèces sensibles se développent normalement, y compris Bacillus alvei lui-même. Sans exclure l'intervention d'une bactériocine, il semble que Bacillus alvei possède plusieurs enzymes, d'action conjuguée : un lysozyme, des enzymes de la protéolyse et une N-acétylase. Lorsqu'on ensemence des bactéries sensibles (Micrococcus lysodeikticus, Bacillus megaterium, certaines souches de Staphylococcus), immédiatement après solidification de la gélose contenant Bacillus alvei, ces bactéries commencent à se développer, donnent des colonies visibles et sont secondairement lysées après douze à vingt quatre heures d'incubation à 37° C. Cette lyse des bactéries, en particulier celle des staphylocoques, favorise le développement de Bacillus alvei à la surface de la gélose et semble jouer le même rôle protecteur que la N-acétylglucosamine.

Mise en évidence de la production de lysozyme, par les staphylocoques

On se place dans des conditions telles que les staphylocoques puissent se développer à la surface de la gélose avant que Bacillus alvei ne le fasse en profondeur. Il suffit pour cela de retarder le développement de Bacillus alvei en l'introduisant dans la gélose sous sa forme sporulée.

A partir d'une culture de trois ou quatre jours de Bacillus alvei (souche 529 de l'Institut Pasteur) sur gélose, on prépare une suspension de spores dans l'eau distillée, en portant la culture au bain-marie à 100° C, pendant trois minutes. La suspension est ensuite diluée de façon à contenir environ 10.000 spores par millilitre, puis conservée à - 10° C. Au moment de l'emploi, on coule dans une boîte de Petri le mélange constitué par 1 ml de cette suspension et 20 ml de gélose fondue. Dès que la gélose est solidifiée, on étale à l'anse de platine en plages de 1 cm de diamètre, les suspensions denses des staphylocoques, en phase de croissance. On met à l'étuve à 37° C pendant dix-huit à vingt-quatre heures. Toutes les souches des staphylocoques se développent; le lysozyme produit par certaines d'entre elles diffuse dans la gélose autour de la plage de culture et forme une zone transparente par inhibition de Bacillus alvei. Selon les dimensions de cette zone, on peut apprécier l'importance de la production de lysozyme. Lorsque le Staphylococcus ne produit pas de lysozyme, Bacillus alvei se développe normalement jusqu'au contact et au-dessous de la plage de culture (34).

Mise en évidence de la résistance de certains staphylocoques à la lyse, par Bacillus alvei.

Si on poursuit l'observation en fonction du temps, on remarque que Bacillus alvei finit toujours par arriver au contact des colonies de staphylocoques et ceci indépendamment de la production

de lysozyme. On peut mettre en évidence ce phénomène plus rapidement, de la manière suivante : au lieu d'incorporer comme précédemment Bacillus alvei à l'état sporulé, on l'inclut sous forme végétative à très forte concentration (10^{-6} à 10^{-7} bactéries par millilitre); dans ces conditions, seules les souches qui résistent au lysozyme et aux enzymes de Bacillus alvei se développent normalement. On peut classer les staphylocoques et les microcoques en quatre types :

- Type I : producteur de lysozyme et lysé par Bacillus alvei.
Type II : non producteur de lysozyme, mais lysé par Bacillus alvei.
Type III : producteur de lysozyme et non lysé par Bacillus alvei.
Type IV : non producteur de lysozyme et non lysé par Bacillus alvei.

Il semble donc que la production de lysozyme soit indépendante de la sensibilité à Bacillus alvei. La plupart des souches de Staphylococcus aureus prélevées chez l'homme appartiennent au type I tandis que les souches provenant de la mammite des bovins appartiennent au type IV. Le type II est formé principalement de Micrococcus et de souches de Staphylococcus epidermidis. Le type III est rarement observé.

CHAPITRE II

RESULTATS OBTENUS PAR LA METHODE AUXOTAB SUR UN SOUCHIER DE REFERENCE

Un soucier de référence comprenant trente souches provenant de collections diverses nous a été fourni; ce soucier comprenait différents résultats concernant le GC %, la fermentation des glucides, les épreuves des lipases, des phosphatases...

Nous avons appliqué à ces souches la méthode Auxotab en y ajoutant les épreuves de résistance à Bacillus alvei (34) et de l'acide glutamique-décarboxylase. En ce qui concerne l'épreuve de résistance à Bacillus alvei nous avons fait figurer sur notre tableau deux sortes de renseignements; soit la bactérie étudiée produit du lysozyme et inhibe la croissance de Bacillus alvei, dans ce cas nous avons noté de 1 à 5 l'intensité de cette inhibition; soit notre souche ne produit pas de lysozyme, elle pourra alors être lysée par Bacillus alvei, cette fois on apprécie l'intensité de la lyse, en utilisant la notation de 1 à 5. L'épreuve de l'acide glutamique-décarboxylase se pratique en présence d'acide glutamique dans les mêmes conditions que celles préconisées par la mise en évidence de l'arginine-décarboxylase (caractère n° 60) et avec les mêmes indicateurs de pH. L'intensité de décarboxylation est mesurée par l'alcalinisation du milieu; elle est notée de 1 à 5.

A - RESULTATS

Les résultats de nos travaux sont réunis sur le tableau n° 7; nous y avons joint les données du GC % telles qu'elles nous ont été fournies avec le numéro de référence des souches. Les résultats d'acidification des glucides ont été condensés pour chaque souche sous forme d'une note moyenne.

Nous avons formé trois groupes, A, B, C.

- Le groupe A est caractérisé par une intense fermentation glucidique, les épreuves de l'arginine-décarboxylase et de l'acide glutamique-décarboxylase sont négatives ainsi que la recherche de la L-alanyl- β -naphthylamide-aminopeptidase; l'épreuve de résistance à Bacillus alvei est positive.

- Le groupe B comprend des souches à caractères peu homogènes. Certaines souches (CCM 2087 et CCM 825) sont même franchement anormales car elles ne donnent que des réactions faibles ou nulles. De plus elles inhibent la croissance de Bacillus alvei en profondeur, tout en la favorisant en surface.

- le groupe C donne une réaction négative avec l'arginine. Deux souches font exception (CCM 1674 et NCTC 7512); l'épreuve de la lyse par Bacillus alvei est en général positive, ainsi que la recherche d'aminopeptidase.

B - DISCUSSION

Nous avons comparé nos résultats avec ceux de Mortensen et Kocur qui avaient étudié les mêmes souches (122) (voir tableau n°8). Nos trois groupements correspondent à ceux de ces auteurs. Nous trouvons dans A les souches appelées Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis. Une souche (CCM 901) appelée St. epidermidis ne possède ni coagulase, ni phosphatase; mais si l'on considère son GC %, son métabolisme glucidique intense, son absence d'aminopeptidase, sa résistance à Bacillus alvei et la présence d'arginine-décarboxylase, cette souche présente tous les caractères de St. aureus.

Le groupe B correspond à certains Staphylococcus et Micrococcus qui ne s'apparentent ni à A ni à C. Bien que le GC % de ce groupe soit en moyenne voisin de 30 ou de 70 %, on ne peut rattacher ces souches aux groupes A ou C, dont les GC % sont eux aussi de 30 et de 70 %, mais dont les critères enzymatiques sont très différents. Alors que dans le groupe A, on retrouve souvent liés ensemble les métabolismes des glucides, des acides aminés et la résistance à Bacillus alvei, une souche du groupe B possède un GC % de 32,8 qui l'apparente au groupe A, mais elle n'acidifie que faiblement les glucides. Il existe donc, dans l'ensemble de ces résultats une discordance qui justifie la création de ce groupe intermédiaire. Une autre souche (CCM 740) possède un GC de 58,8 %; elle aussi présente des résultats anormaux par rapport au reste du souchier. Nous la retrouverons au cours de la discussion des résultats de l'analyse factorielle.

Le groupe C comprend des souches que Mortensen appelle Micrococcus. Comme Mortensen, nous constatons une faible acidification des glucides, dans ce groupe. Le GC % moyen se situe vers 70 %. Le taux des phosphatases est généralement bas dans les deux cas. Ce groupe présente une grande homogénéité biochimique.

Ce souchier de référence nous a été d'une grande utilité pour nos travaux, car il nous a permis d'étudier des bactéries dont nous connaissions déjà beaucoup de caractères. A l'aide de la méthode Auxotab nous arrivons aux mêmes conclusions que Mortensen et Kocur qui ont utilisé des techniques différentes. La création d'un groupe intermédiaire entre les genres Staphylococcus et Micrococcus semble souhaitable, si l'on veut préserver le caractère d'ensemble des groupes A et C. Les épreuves les plus significatives pour un classement des Micrococcaceae peuvent se résumer aux recherches des décarboxylases, de la résistance à Bacillus alvei, de l'aminopeptidase et de la fermentation des glucides.

RESULTATS D'AUXOTAB

	Noms	N ^{os} Référence	G C %	Glucides	Phosphatase	β -Galactosidase	Uréase	DL-Alanyl-amino-peptidase	L-Leucyl-amino-peptidase	Arginine-décarboxylase	Ac. Glut. décarboxylase	Inhibition de <u>B. alvei</u>	Croissance de <u>B. alvei</u>
GROUPE A	<u>St. aureus</u>	CCM 529	34.2	5	5	3	2	.	2	5	.	4	.
	<u>St. epidermidis</u>	CCM 901	35.6	4	1	.	3	.	.	5	.	5	.
	<u>St. lactis</u>	NCTC 7944	36.5	3	1	5	3	.	2	5	.	5	.
	<u>St. aureus</u>	NCTC 4136	32.8	5	5	5	3	.	2	5	.	5	.
	<u>St. aureus</u>	NCTC 8532	31.2	5	5	5	5	.	.	5	.	5	.
	<u>St. aureus</u>	NCTC 6571	32.0	5	5	5	3	.	.	5	.	5	.
	<u>St. aureus</u>	NCTC 4163	31.2	5	5	5	3	.	.	5	.	5	.
GROUPE B	<u>St. saprophyticus</u>	NCTC 7292	31.6	3	.	.	5	.	2	4	.	5	.
	<u>St. saprophyticus</u>	NCTC 7612	30.8	3	.	.	5	.	2	4	4	5	.
	<u>St. lactis</u>	CCM 1400	30.2	2	1	.	3	.	.	5	.	5	.
	<u>St. lactis</u>	NCTC 189	32.8	3	1	5	2	.	.	5	.	5	.
	<u>St. lactis</u>	NCTC 7564	69.0	3	.	5	4	5	5	2	5	4	.
	<u>Micrococcus</u> prés.	CCM 740	58.0	3	3	.	.	5	5	.	5	.	5
	<u>Micrococcus</u> prés.	CCM 2087	68.8	2	.	.	.	1	1	2	3	3	3
	<u>Micrococcus</u> prés.	CCM 825	69.5	2	.	.	2	1	1	2	3	3	3

Noms	N ^{os} Référence	G C %	Glucides	Phosphatase	β -Galactosidase	Uréase	DL-Alanyl-amino-peptidase	L-Leucyl-amino-peptidase	Arginine-décarboxylase	Ac. Glut. décarboxylase	Inhibition de <u>B. alvei</u>	Croissance de <u>B. alvei</u>
<u>Micrococcus</u> prés.	CCM 836	68.3	1	3	.	.	5	5	.	5	.	5
<u>M. roseus</u>	CCM 837	69.7	1	.	.	.	5	5	.	5	.	5
<u>M. roseus</u>	CCM 679	69.0	1	.	.	.	5	5	.	5	.	5
<u>St. roseus</u>	NCTC 7512	72.8	3	4	5	5	.	1	5	.	5	.
<u>St. roseus</u>	NCTC 7511	75.0	1	.	2	3	3	5	2	5	.	5
<u>St. afermentans</u>	NCTC 7563	72.8	.	.	.	2	5	5	.	5	.	5
<u>M. luteus</u>	CCM 132	71.0	1	2	3	2	5	5	.	5	.	5
<u>M. roseus</u>	CCM 560	71.0	.	2	.	.	4	5	.	5	.	5
<u>M. luteus</u>	CCM 385	71.0	.	.	.	.	3	5	.	5	.	5
<u>M. roseus</u>	CCM 633	72.8	.	2	.	.	5	5	.	5	.	5
<u>M. luteus</u>	CCM 337	72.3	.	2	3	4	5	5	2	5	.	5
<u>M. luteus</u>	CCM 1674	71.5	.	3	3	4	5	5	3	5	.	5
<u>M. luteus</u>	CCM 855	73.0	.	3	3	5	5	5	.	5	.	5
<u>M. luteus</u>	CCM 169	71.0	.	2	2	2	5	5	.	5	.	5
<u>M. luteus</u>	CCM 840	71.0	.	2	.	.	5	5	.	5	.	5

1, 2, 3, 4, 5 = notes d'intensité des réactions positives

1, 2 = réactions douteuses

. = réactions négatives

TABLEAU N° 7

RESULTATS DE MORTENSEN (1967)

Noms	Milieu Liq. EVANS 1955		Milieu semi-solide BAIRD-PARKER 1965										Nos Référence	Groupe							
	Glucose Ana.pH	Glucose Aéro.pH	Glucose Ana.	Mannitol Ana.	Glucose Aéro.	Mannitol Aéro.	Galactose Aéro.	Lactose Aéro.	Maltose Aéro.	Mannose Aéro.	Nitrate Réductase	Arginine Décarboxylase			Tween 80 (hydrolyse)	Gélatinase	Coagulase	D.N.A.se	Phosphatase	Acétoïne	Hémolyse
<u>St. aureus</u>	4.3	4.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A ₁
<u>St. epidermidis</u>	4.4	4.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A ₁
<u>St. lactis</u>	4.4	4.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A ₁
<u>St. aureus</u>	4.6	4.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A ₂
<u>St. aureus</u>	4.6	4.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A ₂
<u>St. aureus</u>	4.8	4.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A ₂
<u>St. aureus</u>	4.8	4.9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A ₂
<u>St. saprophyticus</u>	5.7	4.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	X	+	+	+	+	+	+	+	+	B ₃
<u>St. saprophyticus</u>	5.7	5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	X	+	+	+	+	+	+	+	+	B ₃
<u>St. lactis</u>	6.4	5.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	X	+	+	+	+	+	+	+	+	B ₃
<u>St. lactis</u>	6.5	5.9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	X	+	+	+	+	+	+	+	+	B ₃

(Les souches ci-dessus sont "Urée + " et "Oxydase -")

- + = Positif
- = Négatif
- = douteux
- X = Positif en l'absence de milieu nutritif.

Noms	Milieu Liq.		Milieu semi-solide										Nos Référence	Arginine décarboxylase	Tween 80 (hydrolyse)	Gelatinase	Uréase	Oxydase	Phosphatase	Acétoïne	Hémolyse	Groupe	
	EVANS 1955		BAIRD-PARKER 1965																				
	Glucose Ana.pH	Glucose Aéro.pH	Glucose Ana.	Mannitol Ana.	Glucose Aéro.	Mannitol Aéro.	Galactose Aéro.	Lactose Aéro.	Maltose Aéro.	Mannose Aéro.	Nitrate réductase												
<u>St. lactis</u>	NCTC 7564	5.3	4.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Micrococcus prés.</u>	COM 740	6.6	5.0	.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Micrococcus prés.</u>	COM 2087	6.7	5.5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<u>Micrococcus prés.</u>	COM 825	6.8	5.9	.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<u>Micrococcus prés.</u>	COM 836	6.7	6.6	.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<u>M. roseus</u>	COM 837	6.7	6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>M. roseus</u>	COM 679	6.8	6.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>St. roseus</u>	NCTC 7512	6.8	7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>St. roseus</u>	NCTC 7511	6.8	7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>St. afermentans</u>	NCTC 7563	6.8	7.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>M. luteus</u>	COM 132	6.9	6.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>M. roseus</u>	COM 560	6.9	6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>M. luteus</u>	COM 385	6.9	7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>M. roseus</u>	COM 633	6.9	7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>M. roseus</u>	COM 337	6.9	7.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>M. luteus</u>	COM 1674	6.9	7.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>M. luteus</u>	COM 855	7.0	7.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>M. luteus</u>	COM 169	7.0	7.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>M. luteus</u>	COM 840	7.0	7.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

TABLEAU N° 8

(Les sauches des groupes B et C sont "Coagulase-" et "DNase-")

CHAPITRE III

RESULTATS OBTENUS PAR LA METHODE AUXOTAB

SUR DES SOUCHES D'ORIGINES DIVERSES

Les neuf cents souches que nous avons étudiées, nous ont été fournies par l'Institut Pasteur de Lyon (Service du docteur Guilhaumet), les hôpitaux de Lyon et l'Institut Pasteur de Paris.

L'Ecole Vétérinaire de Lyon (Professeur Joubert - Professeur Oudar) nous a procuré les souches d'origine animale.

D'autres souches ont été recueillies dans l'atmosphère et d'autres enfin nous ont été envoyées par la Czechoslovak Collection of Microorganisms (Professeur Kocur).

A - LES RESULTATS

Etant donné le grand nombre de résultats, nous ne donnerons que ceux obtenus pour les quelques souches qui proviennent des souchiers de référence; nous y joindrons les résultats de quelques Staphylococcus qui proviennent des hôpitaux de Lyon, mais dans ce cas là nos souches ne possèdent pas un numéro de référence international. Pour toutes ces bactéries étudiées, les caractères de la

méthode Auxotab qui ne figurent pas sur le tableau n° 10 sont des caractères négatifs. Les résultats de ce tableau correspondent aux valeurs codées, telles qu'elles ont été utilisées dans le calcul; elles ont été définies dans le chapitre "Méthodes d'étude".

Afin de récapituler les résultats obtenus, sous une forme plus pratique, nous avons dressé les tableaux suivants (n° 11 et 12).

Pour chaque épreuve, nous avons fait la moyenne des résultats obtenus et nous avons tracé la courbe de l'intensité enzymatique en fonction du temps.

En abscisse, on trouvera les 62 caractères de la méthode Auxotab et le témoin 00, valable pour les glucides.

En ordonnée, ce sont les différents groupements A, B, C, que nous avons fait apparaître, dans le but de regrouper les souches possédant des caractères métaboliques semblables ou très voisins.

Nous avons noirci l'intérieur des courbes se rapportant à des caractères constants, afin de mieux faire ressortir la positivité de certaines épreuves. Les cases hâchurées signifient que l'épreuve considérée ne donne pas de résultats homogènes pour l'ensemble des souches d'un groupement, bien que l'on obtienne pour chaque souche prise séparément, des résultats identiques d'une fois à l'autre.

SOUCHIER DE REFERENCE

Noms	Numéros	Equivalence
<u>Micrococcus luteus</u>	CCM 210	
" "	" 810	ATCC 398
" "	" 247	NCTC 7011
" "	" 852	
" "	" 622	
<u>M. roseus</u>	" 146	NCTC 7520
"	633	ATCC 412
<u>M. conglomeratus</u>	" 547	ATCC 401
" "	" 208	
" "	" 740	
<u>M. varians</u>	" 1046	ATCC 14852 <u>M. Candidus</u>
<u>M. flavus</u>	I.P. 53155	ATCC 10240
<u>Micrococcus violagabriellae</u>	NCTC 12328	
<u>Staphylococcus aureus</u>	NCTC 4136	
<u>Staphylococcus aureus</u>	NCTC 4163	
<u>Staphylococcus aureus</u>	NCTC 6571	
<u>Staphylococcus aureus</u>	NCTC 8532	
<u>Staphylococcus aureus</u>	TCTC 529	

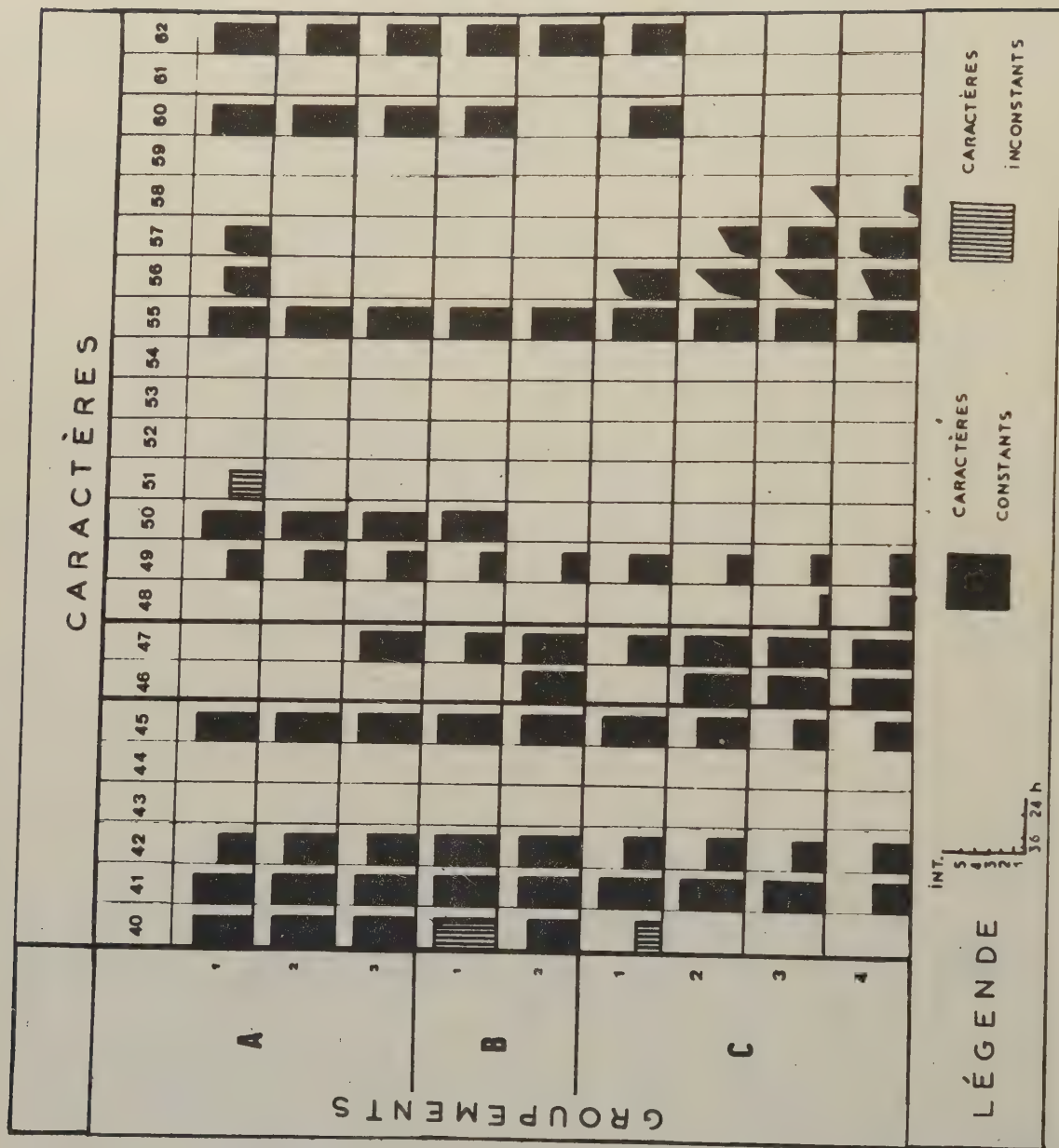
RESULTATS DE LA METHODE AUXOTAB AVEC DES
SOUCHES D'ORIGINES DIVERSES

Nos de Références	Dénomination usuelle	Dénomination proposée	Groupe	Glucose aérobie	Glucose anaérobie	1. Glycérol	2. Ribose	3. D-Xylose	4. Galactose	5. Glucose	6. Fructose	7. Mannitol	8. Sorbitol	9. N-acétyl-glucosamine	10. Amygdaline	11. Lactose	12. Saccharose	13. Tréhalose	14. Phénolphthaléine-di-phosphate	15. β -naphthyl-acétate	16. β -naphthyl-laurate	17. β -naphthyl-nomanoate	18. DL-alanyl- β -naphthylamide	19. Leucyl- β -naphthylamide	20. N-benzoyl-DL-arginine-naphth.	21. B P A N E	22. O N P G	23. Urée	24. Nitrate de potassium	25. Résaurine	26. T T C	27. Arginine	28. p-nitro-phénylphosphate	Coagulase
CCM 210 <u>M. luteus</u>	<u>Micrococcus</u>	C4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	2	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CCM 810 <u>M. luteus</u>	<u>Micrococcus</u>	C4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CCM 247 <u>M. luteus</u>	<u>Micrococcus</u>	C4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	5	5	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
CCM 852 <u>M. luteus</u>	<u>Micrococcus</u>	C4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	1	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CCM 622 <u>M. luteus</u>	<u>Micrococcus</u>	C4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3	5	5	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
CCM 146 <u>M. roseus</u>	<u>Micrococcus</u>	C3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	2	4	5	5	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
CCM 633 <u>M. roseus</u>	<u>Micrococcus</u>	C3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	5	3	4	5	5	1	2	5	1	1	1	1	1	1	1
CCM 547 <u>M. conglomeratus</u>	<u>Micrococcus</u>	C2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	5	4	4	5	5	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
CCM 208 <u>M. conglomeratus</u>	<u>Micrococcus</u>	C2	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	3	2	3	3	3	3	2	5	5	5	5	5	1	5	5
CCM 740 <u>M. conglomeratus</u>	<u>Micrococcus</u>	B2	5	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	4	5	3	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ATCC 14852 <u>M. varians</u>	<u>Micrococcus</u>	B2	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	5	5	5	5	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CCM 1046 <u>M. varians</u>	<u>Micrococcus</u>	B2	5	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	4	4	4	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IP 53155 <u>M. flavus</u>	<u>Micrococcus</u>	C4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	4	5	4	5	5	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
NCTC12328 <u>M. violagabriel</u>	<u>St. epidem.</u>	A2	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

N° de Référence	Dénomination usuelle	Dénomination proposée	Groupement	Glucose aérobis	Glucose anaérobie	Milieu BAIRD-PARKER (1965)	1. Glycérol	No 5. Ribose	No 6. D-Xylose	No 9. Galactose	No 10. Glucose	No 11. Fructose	No 12. Mannose	No 17. Mannitol	No 18. Sorbitol	No 22. N-acétyl-glucosamine	No 23. Amygdaline	No 28. Maltose	No 29. Lactose	No 31. Saccharose	No 32. Tréhalose	No 40. Phénolphtaléine-disphosphate	No 41. β -naphthyl-acétate	No 42. β -naphthyl-laurate	No 45. β -naphthyl-nonaoate	No 46. β -alaninyl- β -naphthylamide	No 47. L-leucyl- β -naphthylamide	No 48. N-benzoyl-DL-arginine-naphth.	No 49. B P A N E	No 50. O N P G	No 51. Urée	No 55. Nitrate de potassium	No 56. Tellurite	No 57. Résaurine	No 58. T T C	No 60. Arginine	No 62. p-nitro-phénylphosphate	Coagulase		
NCTC 4136	<u>St. aureus</u>	<u>St. aureus</u>	A1	5	5		1	1	1	3	4	4	3	1	1	3	3	3	1	3	3	5	5	3	5	1	1	1	1	1	5	5	5	3	4	1	5	5		
NCTC 4163	<u>St. aureus</u>	<u>St. aureus</u>	A1	5	5		3	1	1	3	5	5	2	3	3	3	4	1	1	4	3	5	3	1	3	1	1	1	1	1	1	5	5	5	1	2	1	5	5	
NCTC 6571	<u>St. aureus</u>	<u>St. aureus</u>	A1	5	5		1	2	1	3	5	5	4	3	1	3	3	1	1	4	4	5	5	1	3	1	1	1	1	1	1	5	5	5	3	4	1	5	5	
NCTC 8532	<u>St. aureus</u>	<u>St. aureus</u>	A1	5	5		3	1	1	4	5	5	4	3	3	4	4	4	1	5	4	5	4	3	5	1	1	1	1	1	1	5	5	5	3	5	1	5	5	
NCTC 529	<u>St. aureus</u>	<u>St. aureus</u>	A1	5	5		3	5	1	5	5	3	5	4	3	5	4	3	5	1	5	5	3	3	1	3	1	2	1	1	1	3	2	5	3	3	1	5	3	
609	<u>St. epidermidis</u>	<u>St. epidermidis</u>	A2	5	5		3	1	1	4	4	5	2	2	1	1	1	1	3	1	3	3	5	5	1	4	1	1	1	1	3	4	3	5	1	1	1	4	2	1
610	<u>St. aureus</u>	<u>St. aureus</u>	A1	5	5		3	2	1	3	1	4	3	1	1	4	2	1	3	3	3	1	5	4	3	1	1	1	1	1	3	5	3	5	1	1	1	5	5	
614	<u>St. aureus</u>	<u>St. aureus</u>	A1	5	5		2	1	1	3	5	4	4	3	1	4	2	3	5	5	4	5	5	1	4	1	1	1	1	1	3	5	3	5	1	1	1	5	4	5
615	<u>St. aureus</u>	<u>St. aureus</u>	A1	5	5		3	1	1	2	3	4	3	3	1	4	1	3	5	5	4	5	5	3	3	1	1	1	1	1	3	5	4	5	1	1	1	5	4	5
617	<u>St. aureus</u>	<u>St. aureus</u>	A1	5	5		3	1	1	3	4	5	4	2	1	4	1	4	5	1	4	5	5	1	4	1	1	1	1	1	3	5	3	5	1	1	1	5	4	5
618	<u>St. aureus</u>	<u>St. aureus</u>	A1	5	5		3	1	1	4	4	5	4	3	1	5	1	3	5	4	4	5	5	2	3	1	1	1	1	1	3	5	4	5	1	1	1	5	4	5
620	<u>St. aureus</u>	<u>St. aureus</u>	A1	5	5		2	3	1	3	3	5	3	3	1	5	1	3	2	4	3	5	5	2	4	1	1	1	1	1	3	5	4	5	1	1	1	5	4	5

TABIEAU N° 10

Caractères n°	00 - Témoïn	20 - Méthyl-mannoside
	1 - Glycérol	21 - Méthyl-glucoside
	2 - Erythritol	22 - N-acétyl-glucosamine
	3 - D-Arabinose	23 - Amygdaline
	4 - L-Arabinose	24 - Arbutine
	5 - Ribose	25 - Esculine
	6 - D-Xylose	26 - Salicine
	7 - L-Xylose	27 - Cellobiose
	8 - Adonitol	28 - Maltose
	9 - Galactose	29 - Lactose
	10-- Glucose	30 - Mélibiose
	11 - Fructose	31 - Saccharose
	12 - Mannose	32 - Tréhalose
	13 - Sorbose	33 - Inuline
	14 - Rhamnose	34 - Mélézitose
	15 - Dulcitol	35 - Raffinose
	16 - Inositol	36 - Dextrine
	17 - Mannitol	37 - Amylose
	18 - Sorbitol	38 - Amidon
	19 - Glucosamine	39 - Glycogène



TABEAU 12

SUBSTRATS SYNTHETIQUES

Caractères n°	40 - phénol-phthaléine-disphosphate	50 - O N P G
	41 - β -naphthyl-acétate	51 - Urée
	42 - β -naphthyl-laurate	52 - Tryptophanne
	43 - β -naphthyl-palmitate	53 - Phénylalanine
	44 - β -naphthyl-stéarate	54 - Tryptophanne
	45 - β -naphthyl-nonanoate	55 - Nitrate de potassium
	46 - DL-alanyl- β -naphthylamide	56 - Tellurite de potassium
	47 - L-leucyl- β -naphthylamide	57 - Résazurine
	48 - N-benzoyl-DL-arginine -naphthylamide	58 - T T C
	49 - N-benzoyl-DL-phényl-alanine	59 - B T
		60 - Arginine
		61 - Pyruvate de sodium
		62 - p.nitrophénylphosphate

TABEAU 12

B - ANALYSE DES RESULTATS PAR LA METHODE CLASSIQUE

Nous avons établi un classement sur quatre cents souches dont nous avons soigneusement vérifié la pureté en écartant celles qui provenaient des memes malades, soit que les prélèvements aient été effectués en même temps mais à partir de localisations différentes, soit qu'elles aient été récoltées à plusieurs jours d'intervalle. Nous avons obtenu ainsi un échantillonnage suffisamment varié quant à la provenance de nos souches. Celles-ci sont toutes des cocci à Gram positif, possédant une catalase. Elles se répartissent en trois groupements A, B, C, d'après les caractéristiques de la production d'acide à partir du glucose, en aérobiose et en anaérobiose, dans le milieu de Baird-Parker (1965) - (voir tableau N° 13).

- Le groupement A donne une acidification rapide et intense en 24 à 48 heures, en aérobiose et en anaérobiose; il inhibe la croissance de Bacillus alvei. Il correspond au type I précédemment décrit au cours de l'étude sur le lysozyme.

- Le groupement B donne une acidification soit moins intense, soit moins rapide, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose; vis-à-vis de Bacillus alvei, ce groupement rassemble des souches du type I et II.

- Le groupement C ne donne jamais une acidification du glucose en anaérobiose. Toutefois en aérobiose certaines souches peuvent acidifier le glucose. Les souches de ce groupement n'empêchent pas le développement de Bacillus alvei; elles correspondent au type II

A) Etude du groupement A

Par l'étude de caractères complémentaires, il est possible de décrire à l'intérieur du groupement A trois sous-groupements A1, A2, A3.

CLASSEMENT DES SOUCHES D'ORIGINES DIVERSES

- 125 -

Groupements		A			B		C			
Sous-groupements		A1	A2	A3	B1	B2	C1	C2	C3	C4
Acidification du glucose	Aérobie	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Anaérobie	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Activité amino- peptidasique	DL-alanyl- β - naphthylamide	-	-	-	-	++	-	+++	+++	+++
	L-leucyl- β - naphthylamide	+	+	++	+	++	++	+++	+++	+++
Arginine-décarboxylase		++	++	+	+	-	+	-	-	-
Métabolisme glucidique		+++	+++	+++	++	+	+	+	+	-
Sous-groupes de Baird-Parker		I	II	III V	II III V 2 - 3	(2)	2-3-5	5-6	8	7

(1) Acidification légère diffusée dans toute la hauteur du tube, lecture au 5e jour.

(2) Micrococcus varians ATCC 14852 - Micrococcus conglomeratus CCM 740

TABEAU N° 13

1° - Le sous-groupement A 1

Il se distingue par la présence d'une coagulase, une intense activité phosphatasique (n° 40 et 62), la présence d'une β -galactosidase (n° 50), la réduction des nitrates en nitrites (n° 55), une activité estérasique sur le β -naphtyl-acétate (n° 41) ainsi que sur le β -naphtyl-laurate (n° 42) et le β -naphtyl-nonanoate (n° 45), l'hydrolyse de la N-benzyl-DL-phénylalanine- β -naphtyl-ester (n° 49), l'absence d'aminopeptidase (n° 46 et 47), par une association caractéristique de glucides fermentés.

La fermentation des glucides dans ce sous-groupement est plus importante que dans tous les autres sous-groupements; nous avons pu établir trois subdivisions a, b, et c portant sur 153 souches.

a) La subdivision a comprend 124 souches. Quatre glucides (le galactose n° 9, le glucose n° 10, le fructose n° 11 et le mannose n° 12) sont constamment fermentés.

D'autres glucides sont également fermentés, mais par un pourcentage de souches inférieur.

Ainsi le maltose n° 28 est fermenté par 94 % des souches

le glycérol n° 1	"	"	85 %	"	"
le mannitol n° 17	"	"	85 %	"	"
le saccharose n° 31	"	"	85 %	"	"
le tréhalose n° 32	"	"	80 %	"	"
le sorbitol n° 18	"	"	80 %	"	"

D'autres glucides sont fermentés, mais ces caractères sont déjà moins constants.

La N-acétyl-glucosamine n° 22 est fermentée par 65 % des souches

L'amygdaline n° 23 est fermentée par 65 % des souches

Le lactose n° 29 est fermenté par 50 % des souches

Le ribose n° 5 est fermenté par 23 % des souches.

La liste des glucides énumérés ci-dessus correspond à une acidification d'intensité égale ou supérieure à 3, au bout de 24 heures.

b) La subdivision b comprend 17 souches caractérisées par la fermentation constante du galactose (n° 9), du glucose (n° 10), du fructose (n° 11).

Les autres glucides subissant une fermentation sont classés d'après leur intérêt décroissant, mais nous ne donnons pas de pourcentage vu le petit nombre de souches étudiées; ce sont le saccharose n° 31, le tréhalose n° 32, la N-acétyl-glucosamine n° 22 et le mannitol n° 17.

c) La subdivision c comprend 12 souches qui acidifient toutes le glucose (n° 10), le fructose (n° 11), le mannose (n° 12). Les autres glucides sont classés par ordre d'importance; ce sont le tréhalose (n° 32), le maltose (n° 28), le saccharose (n° 31), la N-acétylglucosamine (n° 22), le mannitol (n° 17), le lactose (n° 29).

2° - Le sous-groupement A 2

Il est très proche du sous-groupement A 1, dont il se différencie par une absence d'acidification du mannitol (n° 17), du mannose (n° 12) du tréhalose (n° 32) en 24 heures. Il ne réduit pas le tellurite de potassium (n° 56) ni la résazurine (n° 57).

3° - Le sous-groupement A 3

Il a un métabolisme glucidique voisin de A 2, mais il se caractérise par la présence d'une L-leucyl- β -naphtyl-amide-amino-peptidase intense (n° 47).

B) Le groupement B

Ce groupement ne manifeste pas un métabolisme glucidique homogène, ce qui laisse supposer qu'il s'agit de variétés ou d'espèces différentes. On distingue les deux sous-groupements B 1 et B 2.

1° - Le sous-groupement B 1 possède la L-leucyl- β -naphtyl-aminopeptidase (n° 47) et une arginine-décarboxylase (n° 60). Certaines souches acidifient les mêmes glucides que le groupement A, mais les acidifications sont plus lentes et moins intenses.

2° - Le sous-groupement B 2 a un pouvoir glucidolytique encore plus faible que B 1. Il possède la L-leucyl- et la DL-alanyl- β -naphtylamide-aminopeptidase (n° 46 et 47), mais les épreuves de l'arginine-décarboxylase (n° 60) et de la β -galactosidase (n° 50) sont négatives.

C) Le groupement C

Il se subdivise en quatre sous-groupements C 1, C 2, C 3 et C 4.

Les trois sous-groupements C 1, C 2 et C 3 acidifient le glucose en aérobiose, contrairement à C 4.

C 1 n'a pas de L-alanyl- β -naphtylamide-aminopeptidase (n° 46), mais possède l'arginine-décarboxylase (n° 60) ce qui le différencie de C 2 et de C 3.

C 2 et C 3 sont très proches, mais C 3 se distingue de C 2 d'après les acidifications du mannose (n° 12), du sorbitol (n° 18), du cellobiose (n° 27); par contre, il n'acidifie pas le saccharose (n° 31).

Une absence totale de fermentation caractérise C 4 qui par ailleurs donne des réactions très proches de C 3 en ce qui concerne les substrats synthétiques.

La présence d'un groupement intermédiaire B se justifie dans un classement basé sur l'acidification du glucose en anaérobiose ou en aérobiose, mais en considérant d'autres épreuves, on peut ramener ce classement à deux groupements (voir tableau n° 14). L'épreuve de l'arginine-décarboxylase est positive avec les souches de A 1, A 2, A 3, B 1 et C 1; elle est négative dans les autres cas. La recherche de la DL-alanyl- β -naphtylamide-aminopeptidase est négative avec A 1, A 2, A 3, B 1, C 1. Quant à la recherche de la L-leucyl- β -naphtylamide-aminopeptidase, elle est négative avec A 1 et A 2. Les quelques souches dont on connaissait le GC % se répartissent également en deux catégories suivant que le pourcentage moyen se situe vers 30 % ou 70 %.

Sous-groupements	A 1	A 2	A 3	B 1	C 1	B 2	C 2	C 3	C 4
Arginine-décarboxylase	++	++	+	+	+	-	-	-	-
DL-alanyl- β -naphtylamide-aminopeptidase	-	-	-	-	-	+	+	+	+
L-leucyl- β -naphtylamide-aminopeptidase	-	-	+	+	+	+	+	+	+
GC % moyen	30 %					70 %			

TABLEAU N° 14

C - DISCUSSION

Après avoir classé nos différentes souches nous avons considéré la dénomination sous laquelle elles nous avaient été proposées.

Dans le groupement A, nous retrouvons le genre Staphylococcus de Baird-Parker; A 1 comprend St. aureus sous-groupe 1, A 2 et A 3 correspondent respectivement aux sous-groupes II, III et V de Baird-Parker. Quant aux autres sous-groupes IV et VI, notre échantillonnage n'en comprenait pas.

Dans le groupe B, on a placé des souches appartenant aux deux genres Staphylococcus et Micrococcus.

B 1 comprend des souches des sous-groupes 2 et 3 appelés Micrococcus par Baird-Parker ainsi que certains Staphylococcus des sous-groupes II, III, IV.

B 2 comprend deux souches dénommées Micrococcus varians (ATCC 14852) et Micrococcus conglomeratus (CCM 740).

Le groupement C s'apparente au genre Micrococcus.

C 1 groupe un certain nombre de souches des sous-groupes 2, 3 et 5 de Baird-Parker.

C 2 correspond au sous-groupe 5 et 6 des Micrococcus. Il comprend notamment Micrococcus conglomeratus (CCM 547 et 208).

C 3 s'identifie à Micrococcus roseus et C 4 à Micrococcus luteus.

Notre classement s'apparente à celui de Baird-Parker dans ses grandes lignes; toutefois nous avons formé trois groupements A, B, C, rassemblant sept sous-groupements tandis que Baird-Parker proposait une classification en deux groupes et quatorze sous-groupes. En prenant l'épreuve de la fermentation du glucose comme base de notre classement, nous nous sommes trouvés devant des acidifications ni franchement positives, ni complètement négatives, aussi il était logique de créer un groupe B renfermant ces souches non-caractéristiques. Nos groupements A et C correspondent bien, par contre, aux deux groupes de Baird-Parker.

Nous n'avons obtenu que sept sous-groupements, rassemblant dans certains cas plusieurs sous-groupes de Baird-Parker. Les caractères que nous avons choisis pour nos sous-groupements ne justifiaient pas une multiplication des subdivisions, toujours possible si l'on considère les biotypes. Notre but était de rassembler le plus grand nombre de souches au moyen de critères qui nous semblaient les plus importants.

Vis-à-vis des résultats de Baird-Parker, la méthode Auxotab offre l'avantage de donner des renseignements sur l'intensité enzymatique des bactéries. De plus, nous avons utilisé des souches en pleine croissance et nous leur avons fourni un milieu faiblement nutritif, alors que Baird-Parker a toujours travaillé sur un milieu enrichi, avec des substrats parfois complexes, comme le jaune d'oeuf par exemple. Il est par conséquent difficile de comparer des résultats obtenus dans des conditions différentes, ce qui explique les inégalités observées. Ainsi la recherche des phosphatases est positive dans nos groupements A et B, alors que pour Baird-Parker, elle est négative dans le sous-groupe V. La recherche d'acétoïne a toujours été négative par notre méthode, alors qu'elle est positive dans les sous-groupements I, II, V de Staphylococcus et 1, 2, 3, 4 de Micrococcus.

Par rapport aux résultats de Mortensen et Kocur, la création d'un groupe B intermédiaire est pleinement justifiée. Ces auteurs se basent sur le pH final obtenu par acidification du glucose en anaérobiose ainsi que sur le GC % de la structure des bactéries; l'épreuve de l'arginine-décarboxylase intervient également dans ce classement.

Nous retrouvons donc une bonne concordance des résultats obtenus par la méthode Auxotab avec ceux obtenus par les épreuves classiques (Baird-Parker, Mortensen, Kocur). Quant aux caractères morphologiques, nous n'en avons pas repris l'étude, Baird-Parker l'ayant déjà fait, en accord avec Prévot et Breed. Le genre Staphylococcus est défini par des amas irréguliers, le genre Micrococcus est défini par la non-fermentation du glucose en anaérobiose, mais il regroupe des souches sans unité morphologique; on y retrouvera aussi bien des amas non plans, irréguliers, que des formations en tétrades.

Baird-Parker justifie la disparition du genre Sarcina qu'il regroupe dans Micrococcus sous-groupe 7 et 8, en montrant que sur 55 souches dénommées Sarcina d'après leur morphologie, seules 20 souches au cours des repiquages ont conservé leur pouvoir de redonner des paquets cubiques. En revanche, Baird-Parker estime que les caractères biochimiques apparentant ces souches aux Micrococcus 7 et 8, sont beaucoup plus stables. En réalité, il n'est pas certain que ces études morphologiques aient été faites dans de bonnes conditions. Comme Colobert et Rocquet (39 bis) l'ont montré, il est nécessaire pour observer la disposition des cocci, d'utiliser un milieu de culture liquide et agité. De plus l'élément caractéristique du genre Sarcina n'est pas la disposition cubique, mais la disposition tétraédrique : trois cocci définissant un plan, le quatrième coccus est en dehors de ce plan.

Sur des données uniquement biochimiques nous avons retrouvé le plan de Prévot. Ainsi notre sous-groupe A correspond à Staphylococcus. Les genres Micrococcus et Sarcina de Prévot se retrouvent dans notre groupement C mais il n'est pas possible de les distinguer sur les données biochimiques dont nous disposons.

Par la création de deux groupements au lieu des trois initiaux (voir tableau n° 14) nous nous rapprochons du principe de Baird-Parker pour qui deux groupes suffisent à classer les Micrococcaceae, mais en même temps nous nous écartons du mode de rangement de cet auteur. En effet nous rassemblons des souches qui n'ont pas les mêmes caractères fermentatifs avec le glucose, par exemple A 1 et C 1, mais ces souches ont d'autres points communs, comme leur comportement vis-à-vis de l'épreuve de Bacillus alvei, de l'arginine-décarboxylase et de l'aminopeptidase.

Il est possible de rattacher les résultats de ces épreuves au GC % comme nous l'avons fait dans le tableau n° 14. Nous avons supprimé le groupe intermédiaire qui ne se justifiait plus d'après les trois épreuves que nous avons choisies, mais il est possible que ce groupe réapparaisse avec un échantillonnage plus varié comme nous le verrons dans le cadre de l'analyse factorielle.

CHAPITRE IV

ANALYSE PAR LE CALCUL FACTORIEL DES RESULTATS OBTENUS PAR LE MOYEN DE LA METHODE AUXOTAB SUR DES SOUCHES D'ORIGINES DIVERSES

Nous nous sommes servis des quatre cents souches précédemment étudiées avec la méthode Auxotab. Les résultats des 62 caractères plus ceux des épreuves d'acidification du glucose décrites par Baird-Parker (1965) et de la coagulase, ont été codifiés pour permettre l'utilisation d'un ordinateur. Les données obtenues pour chaque souche ont été vérifiées au moins deux fois, ce qui conduit finalement à opérer sur plus de 30.000 résultats chiffrés en tenant compte des répétitions.

Le calcul a été effectué à la Faculté des Sciences de Grenoble sur I.B.M. 7044, d'après la méthode de Pontier, méthode déjà appliquée dans l'étude de Bacillus et dont les détails seront publiés prochainement.

A -- RESULTATS

Les résultats du calcul nous ont été adressés sous forme de valeurs numériques attribuées à chaque souche, correspondant aux axes "facteurs" principaux. Les deux premiers axes "facteurs A et B

représentaient chacun 45 % de la variance. La valeur d'un troisième axe "facteur" nous a également été proposée, mais elle ne fournissait pas d'informations supplémentaires, comme nous le verrons ultérieurement. Chaque axe "facteur" représente une corrélation de l'ensemble des caractères, différente suivant A ou B. Par suite des difficultés du calcul, l'importance relative des différents facteurs intéressant chaque souche, n'a pas été calculée mais on pourra toutefois se faire une idée du rôle joué par quelques épreuves.

Au moyen de nos résultats, nous avons pu établir, sur un graphique, la position respective de chaque souche. Nous avons utilisé les deux axes "facteurs" A et B. Comme la séparation entre certaines souches n'étaient pas suffisante, nous nous sommes servis du troisième axe "facteur" C, pour une projection dans l'espace, mais ce troisième axe n'a pas apporté de distinction supplémentaire et pour des raisons pratiques nous n'avons conservé que les axes A et B. L'ensemble des points obtenus s'inscrit de part et d'autre de la bissectrice de l'angle AO-OB (voir figure n° 5).

On distingue deux grands groupes. Le plus éloigné de l'origine O sera dénommé I et l'autre, le plus proche de O sera II. On note, entre I et II la présence de trois souches, dont une (CCM 740) est une souche de référence connue.

En reportant les caractères étudiés sur ces souches nous constatons que le groupe I fermente généralement les glucides. La recherche de la DL-leucyl- β -naphtylamide-aminopeptidase est négative ou faible. L'épreuve de la décarboxylation de l'arginine est positive. Le groupe II présente des caractères tout à fait opposés au groupe I. L'épreuve de la coagulase caractérise surtout l'extrémité du groupe I. Les quelques valeurs des GC % que nous connaissons se situent pour le groupe I vers 30 %, pour le groupe II vers 70 %. Quant à la souche CCM 740 qui se trouve parmi les trois souches intermédiaires, le GC est de 58 %.

GRAPHIQUE OBTENU A PARTIR DES RESULTATS DE L'ANALYSE FACTORIELLE

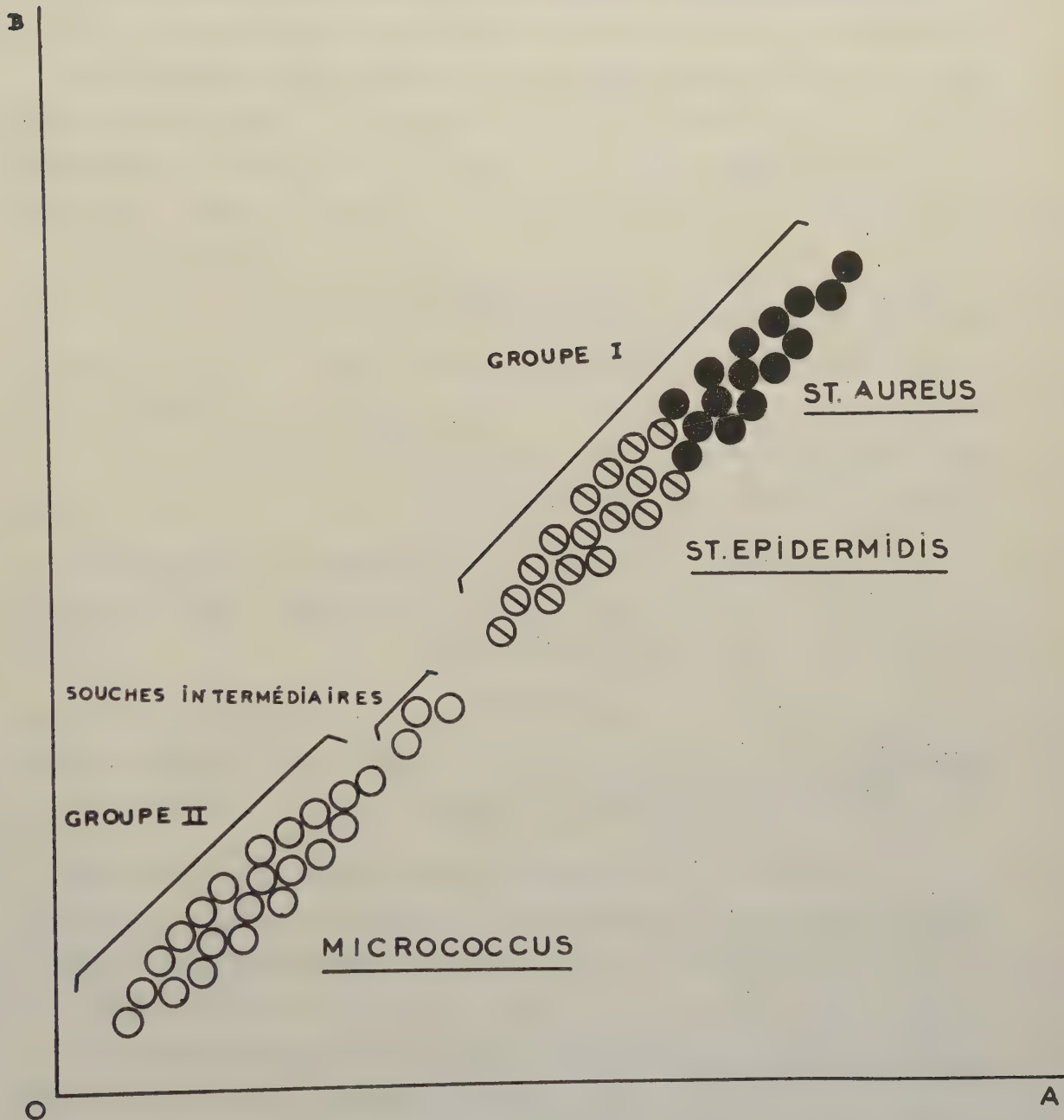


FIGURE N° 5

B - DISCUSSION

En nous rapportant à la dénomination des souches, telle qu'elle nous a été proposée, nous constatons que l'extrémité du groupe I correspond à Staphylococcus aureus de Baird-Parker. En effet cette espèce possède les critères exigés : fermentation anaérobique du glucose, du mannitol, présence de coagulase. Si nous nous rapprochons de l'origine O, nous trouvons dans le groupe I des souches sans coagulase, mais pourvues de phosphatases intenses; ces souches correspondent à Staphylococcus aureus, variété sans coagulase. Enfin la dernière partie de ce groupe I est occupée par des souches dites St. epidermidis par Baird-Parker. Il n'est pas possible de trouver la limite entre les St. epidermidis et les St. aureus; ces souches sont sur un même niveau et l'utilisation du troisième facteur n'apporte rien de plus.

On constate que plus on se rapproche de l'origine O, plus la recherche d'aminopeptidase est positive en même temps que diminue l'intensité du métabolisme glucidique.

Le groupe II comporte des souches que Baird-Parker appelle Micrococcus. Il n'est pas possible d'établir une limite de séparation entre les espèces roseus et luteus qui sont mélangées.

Entre les groupes I et II, on constate une zone de faible densité de souches. Il est difficile d'affirmer que cette séparation correspond à un changement de la constitution bactérienne; il est possible par contre que nous n'ayons pas eu un échantillonnage valable et suffisant dans cette région, ce qui expliquerait ce vide.

Quant aux trois souches, proches du groupe II, elles pourraient faire partie de Micrococcus, mais la présence d'un métabolisme glucidique assez important les empêche de s'introduire complètement dans ce groupe.

Dans notre classement, nous constatons que quelques épreuves suffisent à situer le type I (Micrococcus) et le type II (Staphylococcus) : ce sont les épreuves de la fermentation du glucose, de l'aminopeptidase et de l'arginine-décarboxylase. L'expérience a permis de constater qu'en omettant de signaler la présence de la coagulase pour St. aureus, on déplaçait celui-ci dans les St. epidermidis; il en est de même pour St. epidermidis que l'on retrouve dans les Micrococcus si l'on ne mentionne pas l'épreuve de fermentation du glucose.

Par rapport aux classifications mathématiques de Hill et Silvestri et celle de Rosypal, notre méthode donne des résultats sensiblement analogues.

En effet Hill et Silvestri ont trouvé que Micrococcus roseus et Micrococcus afermentans formaient un seul groupe ainsi que St. lactis et St. saprophyticus, ce que nous sommes en mesure de confirmer; d'ailleurs les deux dénominations lactis et saprophyticus ont été remplacées par epidermidis depuis 1965.

La classification de Rosypal repose sur les subdivisions en GC % et aboutit à la création de nombreux groupes que nous ne retrouvons pas dans notre classification; peut-être est-ce dû au fait que l'échantillonnage de Rosypal était trop restreint, masquant ainsi une continuité possible entre les différents GC %. Toutefois Rosypal a mis en évidence un groupe intermédiaire entre Micrococcus et Staphylococcus, constitué d'une souche dont le GC % est de 54.

Comparons maintenant nos résultats avec ceux de Baird-Parker. Dans le genre Staphylococcus, nous ne pouvons pas distinguer plusieurs espèces, alors que Baird-Parker décrit six sous-groupes. Dans le genre Micrococcus, l'analyse factorielle ne permet pas d'établir de subdivisions, ce qui montre la fragilité des critères utilisés par Baird-Parker qui y définit huit sous-groupes. Dans la

classification de Baird-Parker, la formation d'un groupe de souches intermédiaires n'est pas envisagé, alors que par notre méthode et en accord avec de nombreux auteurs, nous pensons que sa création est justifiée.

L'utilisation de la méthode Auxotab avec ses soixante-deux caractères ne contribue pas à multiplier les divisions entre espèces, mais bien au contraire à rassembler le plus grand nombre de souches sous une même dénomination, tout en attribuant à chaque souche un caractère propre qui la distingue de ses voisins les plus proches. De plus on met en relief une variation continue des caractères, qui, à première vue n'est pas forcément évidente.

L'analyse factorielle confirme non seulement l'essai de classification de type aristotélien que nous avons effectué au préalable, mais également la classification des Micrococcaceae (classification de Baird-Parker 1965).

CHAPITRE V

CORRELATIONS ENTRE LE POUVOIR PATHOGENE

ET LES CARACTERES BIOCHIMIQUES

Les souches que nous a procuré l'Institut Pasteur comportaient une fiche signalétique concernant l'origine du prélèvement. Nous avons comparé les résultats des épreuves biochimiques obtenues avec la méthode Auxotab, avec la provenance de ces souches. Nous avons constaté que les staphylocoques pathogènes (ainsi dénommés en raison de leurs prélèvements dans des foyers infectieux) avaient en général un certain nombre de caractères positifs comme la recherche de la coagulase, une acidification du glucose, mannose, galactose et fructose, des phosphatases intenses, la présence de l'arginine-décarboxylase. De plus ils manifestaient une résistance à Bacillus alvei. On rencontre ce type de bactéries surtout dans le sous-groupement A 1, mais les autres sous-groupements A 2, A 3 et A 4 en contiennent également. Cette constatation n'est pas uniquement personnelle et il est bien admis aujourd'hui que des Staphylococcus epidermidis puissent avoir un caractère pathogène.

Dans le groupement B nous n'avons pas trouvé de souches d'origine pathologique, mais nous n'avons que peu de souches dans cette catégorie et il est difficile de donner une conclusion valable.

Quand au groupe C, il ne contenait pas de souches dites pathogènes.

L'analyse factorielle nous a permis d'établir un graphique sur lequel nous avons placé nos souches en fonction de leurs caractères biochimiques. Bien que l'origine des prélèvements n'ait pas figuré dans le calcul, il est possible de faire quelques remarques à ce sujet.

Le groupe I est seul à détenir un pouvoir pathogène. Dans l'ensemble, on constate que le pouvoir pathogène appartient surtout à la partie supérieure du groupe I, mais on doit bien préciser que des souches très pathogènes se trouvent également dans la partie inférieure de ce groupe. On ne peut par conséquent délimiter une zone de pouvoir pathogène, ce qui d'ailleurs n'aurait pas de signification. En effet on ne peut affirmer qu'une souche prélevée au cours d'une septicémie engendrera chez un autre sujet la même infection.

Devant une souche d'origine inconnue que l'on placerait d'après ses caractères biochimiques dans la région supérieure du groupe I on est réduit à formuler des hypothèses au sujet du pouvoir pathogène, bien que d'après la situation de cette souche il est probable qu'elle soit pathogène, probabilité qui va en s'accroissant quand on se déplace de Staphylococcus epidermidis à Staphylococcus aureus.

CHAPITRE VI

CONCLUSION

Nous avons étudié par le procédé Auxotab mis au point par Buisnière et Colobert, un ensemble de souches appartenant à la famille des Micrococcaceae, soit déjà identifiées et qui nous ont servi de références, soit isolées depuis peu et d'origines diverses. Le procédé Auxotab a l'avantage d'être particulièrement rapide et de mise en oeuvre facile, mais il a l'inconvénient d'être, dans son principe même, très différent des procédés utilisés jusqu'ici par les bactériologistes pour étudier l'équipement enzymatique des bactéries. Nous en tirons les conclusions suivantes :

1°) - Dans le cas des souches de référence, le procédé Auxotab permet de retrouver les groupements individualisés jusqu'ici (genres, espèces), ce qui témoigne de la valeur de ce procédé. Notamment, il est facile d'individualiser le genre Staphylococcus et le genre Micrococcus tels qu'ils sont définis dans le Bergey's Manual. Le procédé Auxotab permet de définir le premier comme groupant des bactéries utilisant intensément le glucose en anaérobiose, et possédant une arginine-décarboxylase. En revanche elles ne possèdent pas d'aminopeptidase leur permettant d'hydrolyser le DL-alanyl- β -naphtylamide et ne sont pas lysables par Bacillus alvei. Le genre Micrococcus groupe des bactéries n'utilisant le glucose qu'en aérobiose, possédant une aminopeptidase active sur le DL-alanyl- β -naphtylamide et sur le L-leucyl- β -naphtalamide. Elles ne possèdent pas d'arginine-décarboxylase, et sont lysables par Bacillus alvei.

A l'intérieur du genre Staphylococcus, il est facile de distinguer Staphylococcus aureus qui est caractérisé par la présence de coagulase, de phosphatases très actives et la capacité d'utiliser le mannitol.

2°) - Il est remarquable que la seule considération de caractères physiologiques tels qu'ils sont apportés par le procédé Auxotab, permette de distinguer des groupes définis sur la base de la composition de leur acide désoxyribonucléique.

3°) Les résultats de l'analyse factorielle confirment ceux de Hill et Silvestri et démontrent l'existence parmi les quatre-cents souches étudiées, de deux groupements naturels, le groupe I réunissant les Micrococcaceae décrits jusqu'ici sous les noms de Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis, le groupe II les souches décrites sous les noms de Sarcina et Micrococcus. Le premier groupe correspond donc exactement à la tribu des Staphylococceae et le second à la tribu des Micrococceae telles qu'elles sont définies par Prévot. Il est en revanche illusoire de chercher à distinguer par les moyens utilisés, des groupes plus petits correspondant par exemple à des genres ou des espèces à l'intérieur de ces tribus, du fait de l'existence de tous les intermédiaires possibles.

4°) Le pouvoir pathogène demeure difficile à évaluer, sans doute parce qu'il ne dépend pas exclusivement de la souche bactérienne, mais aussi du terrain c'est-à-dire de la réceptivité de l'animal. Le caractère pathogène est en corrélation étroite d'une part avec l'aptitude à utiliser intensément le glucose aussi bien en anaérobiose qu'en aérobiose et d'autre part avec un équipement enzymatique particulièrement complet. On doit considérer comme "pathogènes"

ou mieux comme "pouvant être pathogènes" toutes les souches appartenant au groupe I correspondant à la tribu des Staphylococceae, et "non pathogènes" celles du groupe II correspondant à la tribu des Micrococceae.

Le Président de la Thèse :

Professeur COLOBERT

VU et permis d'imprimer,

LYON, le 12 février 1968

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université :

P. LOUIS

VU, le Doyen :

J.F. CIER

B I B L I O G R A P H I E

1. ABD-EL-MALEK Y., GIBSON T.
Studies in the bacteriology of milk. The Staphylococci and Micrococci of milk.
J. Dairy Res., (1948), 15, 249-260.
2. ADANSON
Cité par COLOBERT L.
Pathologie-Biologie, (1965), 13, 204-215.
3. ANDERSEN E.K.
Studies on the specificity of pemphigus Staphylococci.
Acta Path. Microb. Scand., (1943), 20, 242-256.
4. ANGYAL T.
Studies on the classification pathogenicity and antigenic structure of Staphylococci. The occurrence and pathogenicity of "Micrococcaceae".
Acta Microb. Acad. Sci. Hung., (1961), 8, 127-139
5. ANGYAL T.
Examination of Staphylococci isolated from faeces.
Acta Microb. Acad. Sci. Hung., (1961), 8, 149-157.
6. ANKINA T.P., GOLOSAVA T.V.
Effect of lysozyme on phagocytic capacity of leukocytes in vitro.
Antibiotiki, (1966), 11 (5), 446-450.
7. ANONYMOUS
Recommendations Subcommittee on taxonomy of Staphylococci and Micrococci.
Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon., (1965), 15 (2), 109-110.
8. AULETTA A.E., KENNEDY E.R.
Deoxyribonucleic acid base composition of some members of the Micrococcaceae.
J. Bacteriol., (1966), 92, 28-34.

9. BAIRD-PARKER A.C.
A classification of Micrococci and Staphylococci based on physiological and biochemical tests.
J. Gen. Microbiol., (1963), 30, 409-427.
10. BAIRD-PARKER A.C.
The classification of Staphylococci and Micrococci from world sources.
J. Gen. Microbiol., (1965), 38, 363-387.
11. BAIRD-PARKER A.C.
Subcommittee on taxonomy of Staphylococci and Micrococci. Minutes of first meeting.
Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon., (1965), 15, 107-108.
12. BAIRD-PARKER A.C.
Classification des staphylocoques.
Médecine et Hygiène, (1965), 683, 371-372.
13. BARBER M., KUPER S.W.A.
Identification of Staphylococcus pyogenes by the phosphatase reaction.
J. Path. Bact., (1951), 63, 65-68.
14. BARBU E., RAMPINI C.
Colloque sur les lysozymes
Le lysozyme des phages.
Exposés annuels de Biochimie Médicale (1966), 27e Série, 85-100.
15. BARNES E.H., MORRIS J.F.
A quantitative study of the phosphatase activity of Micrococcus pyogenes.
J. Bacteriol., (1957), 73, 100-104.
16. BETTY C., HOBBS B.S.C.
A study of the serological type differentiation of Staphylococcus pyogenes.
The Journal of Hygiene, (1948), 46, 222-238.
17. BIGGER J.W.
cité par BLAIR J.E.
Bact. Rev. (1962), 26, 375-381.
18. BLAIR J.E.
Factors determining the pathogenicity of Staphylococci.
Annual Review of Microbiology, (1958), 12, 491-506.

19. BLAIR J.E., CARR M.
The techniques and interpretation of phage typing of Staphylococci.
Jour. Lab. and Clin. Med., (1960), 55, 650-662.
20. BLAIR J.E., WILLIAMS R.E.O.
Phage typing of Staphylococci.
Bull. Org. Mond. Santé, (1961), 24, 771-784.
21. BLAIR J.E.
What is a Staphylococcus.
Bact. Rev., (1962), 26, 375-381.
22. BLOBEL H., BERMAN D.T.
Further studies on the in vivo activity of staphylocoagulase.
J. Infect. Dis., (1961), 108, 63-67.
23. BOHACEK J., KOCUR M., MARTINEC T.
Reports from the conference on the taxonomy of bacteria held in the ozechoslovak collection of microorganisms.
Sept.-Oct. (1965), 318-322.
24. BOHACEK J., KOCUR M., MARTINEC T.
D.N.A. base composition of some Micrococci.
J. Gen. Microbiol., (1967), 46, 369-376.
25. BORST-PAUWELS G.W.F.H., REYNEN R.
Use of phenolphthalein diphosphate in the determinial of yeast cells.
Anal. Biochem., (1965), 10, 208-217.
26. BRAGA A., ALBANO A.
Su di alcune prove proposte par differenziare gli stafilococchi dai micrococchi. Studio di 150 stipiti di Micrococcaceae da carne e da salumi.
Boll. Ist. Sicroterap. Milan, (1965), 44, 104-111.
27. BREED R.S., MURRAY E.G.D., HITCHENS A.P.
Bergey's manual of determinative bacteriology, 6th edition.
The williams and Wilkins Company, Baltimore, Md., (1948).
28. BREED R.S., MURRAY E.G.D., HITCHENS A.P.
Bergey's manual of determinative bacteriology, 7th edition.
The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Md. (1957).

29. BRETON B., BONNOT G., NARDON P., LAVIOLETTE P.
C.R. Acad. Sci. Paris, Série D, (1967), 265, 161-164.
30. BUISSIÈRE J., COLOBERT L.
Influence de l'état lysogène sur la morphologie des colonies, les caractères biochimiques et pathogènes de Bacillus alvei.
C.R. Acad. Sci. Paris, (1966), 263, 570-572.
31. BUISSIÈRE J., LARRIBAUD J.
Symposium International sur les contaminations intrahospitalières.
2-3 décembre 1966.
32. BUISSIÈRE J., FOURCARD A., COLOBERT L.
Usage des substrats synthétiques pour l'étude de l'équipement enzymatique de microorganismes.
C.R. Acad. Sci. Paris, (1967), 415-417.
33. BUISSIÈRE J., NARDON P.
Microméthode d'identification des bactéries. Intérêt de la quantification des caractères biochimiques.
(à paraître).
34. BUISSIÈRE J., MORELIS P., CHAMBON P., FONTANGES R.
Aspect morphologique de la lyse des staphylocoques par Bacillus alvei. Rôle du lysozyme.
Ann. Inst. Pasteur, (1967), 113, 357-362.
35. CANNON F.D., HAWN C.V.Z.
Slide test for coagulase positive Staphylococci.
Am. J. Clin. Pathol., (1961), 35, 468-471.
36. CANNON F.D., HAWN C.V.Z.
Phosphatase activity of Staphylococcus aureus, correlation of enzyme production with resistance to penicillin and phage pattern.
J. Bacteriol., (1963), 86, 1052-1056.
37. CHAPMAN G.H.
A single culture medium for selective isolation of plasma coagulating Staphylococci and improved testing of chromogenesis plasma coagulation; mannitol fermentation and the stone reaction.
J. Bacteriol., (1946), 51, 409-410.

38. CHRISTIE R., KEOGH E.V.
Physiological and bacteriological characteristics of Staphylococci of human origin.
J. Path. Bact., (1940), 51, 188-197.
39. COHEN S.G., DZURY D.S., MICHELINI F.J.
Immune responses to "Staphylococcus" antigens.
J. Infect. Dis., (1958), 103, 61-66.
- 39 bis. COLOBERT L., ROCQUET G.
Position taxonomique de Micrococcus lysodeikticus et de Coccus P. Caractère contingent de la sécrétion de protéines chez certaines espèces du genre Sarcina.
Ann. Inst. Pasteur, (1957), 93, 663-670.
40. COLOBERT L.
L'espèce Streptococcus faecalis et sa valeur en tant que témoin de la pollution fécale.
Revue du Corps de Santé, (1962), 3 (3), 617-630.
41. COLOBERT L., BLONDEAU H.
L'espèce Streptococcus faecalis.
I. Etude de l'homogénéité par la méthode adansonienne.
Ann. Inst. Pasteur, (1962), 103, 345-362.
42. COLOBERT L.
Classification bactérienne et taxométrie.
Pathologie-Biologie, (1965), 13, 204-215.
43. COLOBERT L.
Symposium International sur l'avenir des animaux de laboratoire.
18-20 septembre 1966, Ed. Mérieux, 53-56.
44. COLOBERT L.
Action du lysozyme sur les bactéries à gram négatif.
Exposés annuels de biochimie médicale. Colloque sur les lysozymes.
27ème série (1966), 45-65.
45. COTTEREAU P.H., BUISSIÈRE J., DE SAINT AUBERT G.
Soc. Sci. Vét. et de Méd. Comparée de Lyon.
Séance du 2 décembre 1967.
46. COWAN S.T.
The classification of Staphylococci by precipitation and serological reactions.
J. Path. Bact., (1938), 46, 31-45.

47. COWAN S.T.
Classification of Staphylococci by slide agglutination.
J. Path. Bact., (1939), 48, 169-173.
48. COWAN S.T.
An introduction to the chaos, or the classification of
Micrococci and Staphylococci.
J. Appl. Bact., (1962), 25, 324-340.
49. COWAN S.T., STEEL K.J.
Comparison of differentiating criteria for Staphylococci
and Micrococci.
J. Bacteriol., (1964), 88, 804-805.
50. CUMMINS C.S., HARRIS H.
Differences in cell-wall composition among Gram positive
cocci and bacilli.
J. Gen. Microbiol., (1955), 13, iii.
51. CUMMINS C.S., HARRIS H.
The relationships between certain members of the Staphy-
lococcus - Micrococcus group as shown by their cellwall
composition.
Int. Bull. of Bacteriol. Nomencl. and Taxon., (1956), 6,
111-119.
52. DEFAYOLLE M., COLOBERT L.
L'espèce Streptococcus faecalis.
II. Etude de l'homogénéité par l'analyse factorielle.
Ann. Inst. Pasteur, (1962), 103, 505-522.
53. DEFAYOLLE M., PONTIER J., PONCET L., BUISSIÈRE J., COLOBERT L.
Biométrie-Praximétrie - Bruxelles
(à paraître).
54. DELAUNAY A., PELLETIER M., BAZIN S.
Effets exercés in vitro et in vivo par un complexe poly-
peptidique extrait du thymus de veau.
Exposés annuels de Biochimie Médicale. Colloques sur les
lysozymes. 27e Série (1966), 111-129.

55. DELEZENNE

cité par MOCH B.

Essai de détermination de la pathogénie des staphylocoques par leurs propriétés biochimiques et enzymatiques.

Thèse de Pharmacie, Strasbourg, (1964).

56. DELMOTTE A.

Un nouveau test de virulence pour Staphylococcus aureus.

Activité lipolytique par la méthode de Sierra.

Arch. Belges Dermatol. Syphilig., (1959), 15, 243-266.

57. D'HERELLE F.

cité par VERGEZ P.

La lysotypie des Staphylocoques : son application en épidémiologie.

Thèse de Médecine, Paris, (1964).

58. DLABAC V.

Some characteristics of acid phosphomonoesterases produced by strains of Staphylococci and Micrococci.

J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., (1965), 60, 60-66.

59. EKNER L.

Recherche sur les antigènes staphylococciques : fibrinolysine, hémolysine.

Thèse Pharmacie, Strasbourg, (1960).

60. EKSTEDT R.D., YOTIS W.

Studies on Staphylococci. Effect of coagulase on the virulence of coagulase negative strains.

J. Bacteriol., (1960), 80, 496-500.

61. EKSTEDT R.D.

Immunité envers l'infection à staphylocoques.

Med. et Hyg., (1965), 683, 377-378.

62. ELEK S.D., LEVY E.

Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic Staphylococci.

J. Path. Bact., (1950), 62, 541-554.

63. ELEK S.D.

Experimental staphylococcal infections in the skin of man.

Ann. N.Y. Acad. Sc., (1956), 65, 85-90.

64. EVANS J.B.
Studies of Staphylococci with speed reference to the coagulase positive types.
J. Bacteriol., (1948), 55, 793-800.
65. EVANS J.B., BRADFORD W.L., NIVEN C.F.
Comments concerning the taxonomy of the genera Micrococcus and Staphylococcus.
Int. Bull. Bact. Nomencl. Taxonom., (1955), 5, 61-66.
66. EVANS J.B.
Current views and problems relating to the taxonomy of the Micrococcaceae.
Int. Bull. Bact. Nomencl. Taxonom., (1965), 15, 111-112.
67. FISK R.T.
Studies on Staphylococci : I. Occurence of bacteriophage carriers amongst strains of Staphylococcus aureus.
J. Infect. Dis., (1942), 71, 153-160.
68. FISK R.T.
Studies on Staphylococci : II. Identification of Staphylococcus aureus by means of bacteriophage.
J. Infect. Dis., (1942), 71, 161-165.
69. GAUSE G.G., LOSHRAREVA N.P., ZBARSKY J.B., GAUSE F.F.
D.N.A. base composition in certain bacteria and their mutants with impaired respiration.
Nature, (1964), 203, 598-599.
70. GILLESPIE W.A., ALDER V.G.
cité par MOCH B.
Essai de détermination de la pathogénie des staphylocoques par leurs propriétés biochimiques et enzymatiques.
Thèse de Pharmacie, Strasbourg, (1964).
71. GOLDBACH W., HAENEL H.
Über Lysozym und Proteasen Bildung bei Staphylokokken.
Zbl. Bakteriол. I Abt. Orig., (1964), 195 (2), 201-205.
72. GOLDBERG J.A., RUTENBURG A.M.
The coloric determination of leucine-amino-peptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases.
Cancer (1958), 11, 283-291.

73. GOMORI G.

The microtechnical demonstration of sites of lipase activity.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., (1945), 58, 362-364.

74. GORET P.

Staphylocoques animaux et Staphylocoques humains.

Maroc Médical, (1955), 362, 946-951.

75. GRUN L., KUHN H.

Erfahrungen und Ergebnisse bei der serologischen Untersuchungen von Staphylococcus pyogenes aureus.

Z. Hyg. Infekt. Kr., (1957), 144, 535-548.

76. GRUN L.

Serologische Untersuchungen an pyogenen Staphylokokken.

Z. Hyg. Infect. Kr., (1957), 144, 238-247.

77. GRUN L.

Über ein neues Staphylokokken Antigen.

Z. Hyg. Infekt. Kr., (1958), 145, 259-262.

78. GRUN L., MULLER C.

Über den Wert selektiver Nährboden zur Züchtung pathogener Staphylokokken.

Z. Hyg. Infekt. Kr., (1964), 150, 96-102.

79. GRUN L.

Die Mannitspaltung pathogener und apathogener Staphylokokken unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

Z. Hyg. Infekt. Kr., (1964), 150, 234-238.

80. HALE J.H., SMITH W.

The influence of coagulase on the phagocytosis of Staphylococci.

Brit. J. Exptl. Pathol., (1945), 26, 209-216.

81. HAUKENES G., OEDING P.

On two new antigens in Staphylococcus aureus.

Acta Pathol. Microbiol. Scand., (1960), 49, 237-248.

82. HILL L.R., SILVESTRI L.G., IMM P., FRACHI G., LANCIANI P.
Automatic classification of Staphylococci by principal-component analysis and a gradient method.
J. Bact., (1965), 89, 1393-1401.
83. HINE T.G.M.
Serological classification of the Staphylococci.
Lancet, (1922), 2, 1380-1382.
84. HOEPRICH P.D., CROFT G.F., WEST L.W.
Tellurite reduction as an indicator of potentially pathogenic Staphylococci.
J. Lab. Clin. Med., (1960), 55, 120-128.
85. HORIUCHI T. et S., MIZUNO D.
A possible negative-feed-back phenomenon controlling formation of alkaline phosphomonoesterase.
Nature, (1959), 183, 1529-1530.
86. HUGGINS Ch., LAPIDES J.
Chromogenic substrates : Acyl esters of para-nitro-phenol as substrates for the colorimetric determination of esterase.
J. Biol. Chem., (1947), 170, 467-482.
87. HUGH R., LEIFSON E.
The taxonomic significance of fermentation versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria.
J. Bact., (1953), 66, 24.
88. HUNT T.
cité par ROUNTREE P.M.
The origin and spread of virulent Staphylococci.
VIIIth International Congress for Microbiology, Montreal, (1962), 561-569.
89. INNISS W.E., SANCLEMENTE C.
Biochemical studies on staphylocoagulase and an allied phosphatase activity.
J. Bact., (1962), 83, 941-947.

90. IVLER D.

Metabolic comparison of pathogenic and non pathogenic Staphylococci.

Eighth International Congress for Microbiology.

Abstracts (Montréal), (1962) E, 33 A.5, 112.

91. IVLER D.

La virulence des Staphylocoques : étude comparative de différentes souches.

Médecine et Hygiène, (1965), 683, 672-673.

92. JACHERTS D.

Experimentelle Untersuchungen über die Identität freier und gebundener Koagulase.

Z. Hyg. Infekt. Kr., (1956), 142, 502-509.

93. JACOBS S.I., WILLIS A.T., GOODBURN G.M.

Pigment production and enzymatic activity of Staphylococci : the differentiation of pathogens from commensals.

J. Path. Bact., (1964), 87, 151-156.

94. JAY J.M.

Production of lysozyme by Staphylococci and its correlation with three other extracellular substances.

J. Bact., (1966), 91 (5), 1804-1810.

95. JEANLOZ R.W.

Colloque sur les lysozymes. Substrats du lysozyme. Structure chimique.

Exposés annuels de Biochimie Médicale. (1966), 27e série, 45-63.

96. JELJASZEWICZ J.

Some experiments in staphylocoagulase. Methods of determination of free and bound coagulase.

Acta Microbiol. Polonica, (1958), 7 (1), 17-33

97. JESSEN O., ROSENDAL V., FABER K.

Some properties of Staphylococcus aureus possibly related to pathogenicity. Bacteriological investigations of Staphylococcus aureus strains from four hundred and sixty two cases of bacteriaemia.

Acta Path. Microbiol. Scand., (1963), 58, 85-98.

98. JOLLES P.
Colloque sur les lysozymes. Chimie et biochimie des lysozymes.
Exposés annuels de Biochimie Médicale. (1966), 27e série,
1-30.
99. JULIANELLE L.A.
Studies of haemolytic Staphylococci.
J. Infect. Dis. (1922), 31, 256-284.
100. JULIANELLE L.A., WIEGHARD C.W.
Immunological specificity of carbohydrates derived from
Staphylococci.
Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y., (1934), 31, 947-949.
101. KAMINSKA M.
Influence of human sera of various origin on the oxygen
uptake by some strains of Staphylococci.
Postepy. Mikrobiol., (1965), 5, 273-276.
102. KAPRAL F.A., LI I.W.
Virulence and coagulase of Staphylococcus aureus.
Proc. Soc. Exp. Biol., (1960), 104, 151-153.
103. KASHIDA S.
Lysozyme : an index of pathogenic Staphylococci.
Biken's Journal, (1959), 2 (2), 50-55.
104. KEDZIA W.
The phosphatase activity of coagulase-positive Staphylococcus
coccus strains isolated from patients and from healthy
persons.
J. Path. Bact., (1963), 85, 528-529.
105. KING E.J.
Preparation of phenolphthaleine phosphate.
J. Path. Bact., (1943), 55, 311-314.
106. KOCUR M., PRECECHTEL F., MARTINEC T.
Haemolysins in coagulase-negative Staphylococci.
J. Path. Bact., (1966), 92, 331-336.

107. KOCUR M., MARTINEC T., ZDENA MATERNOVA
Reports from the conference on the taxonomy of bacteria held in the Czechoslovak collection of microorganisms. Current views of the classification of the genus Micrococcus.
(Sept. 1966), 276-277.
108. KOLLE W., OTTO R.
Die Differenzierung der Staphylokokken mittelst der Agglutination.
Z. Hyg. Infekt. Kr., (1902), 41, 369-379.
109. KRYNSKI S., KEDZIA W.
Différences d'activités biochimiques chez Staphylococcus pyogenes prélevé dans les produits pathologiques et chez les sujets sains.
Ann. Inst. Pasteur, (1962), 102, 231.
110. KRYNSKI S., KEDZIA W.
Some differences between Staphylococci isolated from pus and from healthy carriers.
J. Infect. Dis., (1964), 114, 193-202.
111. LIEB F.L., BRENNEIS B.
Über Proteasen des Staphylokokken pyogenes aureus.
Arch. Hyg. (Berlin), (1961), 145, 161-166.
112. LOEB L.
The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood.
J. Med. Res., (1903), 10, 407
113. LOVELL H.R.
Incorporation of disodium-para-nitro-phenyl-phosphate in solid medium for the detection of phosphatase production by "Micrococcus pyogenes var. aureus".
Nature, (1958), 181, 995-996.
114. MAC DONALD J.
Location of proteinase, peptidase, catalase and NADH-oxydase in cells of Staphylococcus lactis.
Canad. J. Microbiol., (1964), 10, 197-200.

115. MARCHAT Y.
Les staphylococcies des petits ruminants.
Thèse Faculté de Médecine de Paris, (1962).
116. MARINELLI M., TONELLI E., VENTURI R.
Attività fosfatasica potere patogeno dello Stafilococco.
G. Bath. Vinal. Immun., (1958), 51, 561-572.
117. MARMUR J., DOTY P.
Determination of the base composition of DNA from its
thermal denaturation temperature.
J. Mol. Biol., (1962), 5, 109-118.
118. MITINA U.S.
Phosphatase activity of some species bacteria.
Zhur. Mikrobiol. Epidemiol. i Immunibiol., (1960), 31,
N° 11, 105-108.
119. MOCH B.
Essai de détermination de la pathogénie des Staphylocoques
par leurs propriétés biochimiques et enzymatiques.
Thèse de Pharmacie de Strasbourg, (1964).
120. MORRISON R.B.
The coagulase test in the identification of pathogenic
Staphylococci.
(Symposium on Staphylococci and Micrococci).
J. Appl. Bact., (1962), 25 (3), 432-435.
121. MORSE S.I.
Isolation and properties of a surface antigen of Staphy-
lococcus aureus.
J. Exptl. Med., (1962), 115, 295-311.
122. MORTENSEN N., KOCUR M.
Correlation of DNA base composition and acid formation
from glucose of Staphylococci and Micrococci.
Acta Path. Microbiol. Scand., (1967), 69, 445-457.
123. MOSSEL D.A.A.
Attempt in classification of catalase-positive Staphylo-
cocci and Micrococci.
J. Bact., (1962), 84, 1140-1147.

124. MUCH H.
Über eine Vorstufe der Fibrinfermentes in Kulturen von
"Staphylococcus aureus".
Biochem. Z., (1908), 14, 143-155.
125. MULLER H., HORN M.
Untersuchungen über Harnstoff Spaltung durch Staphylo-
kokken.
Zbl. Bakt. I Abt. Orig., (1962), 187, 308-321.
126. MUNCH-PETERSEN E.
Staphylococcal coagulase.
Zbl. Bakt. Referate, (1961), 178, 377-399.
127. MURPHEY W.H., ROSENBLUM E.D.
Biochemical observations on mannitol-negative mutants of
Staphylococcus aureus.
Texas Repts. Bioch. Med., (1963), 21 (1), 104-105.
128. MURPHEY W.H., ROSENBLUM E.D.
Mannitol catabolism by Staphylococcus aureus.
Arch. Biochem. Biophys., (1964), 107 (2), 292-297.
129. NACHLAS M.M., SELIGMAN A.M.
Evidence for the specificity of esterase and lipase by
the use of three chromogenic substrates.
J. Biol. Chem., (1949), 181, 343-355.
130. NICOLLE M., FLEMING A.
cités par JOLLES P.
Exposés annuels de biochimie médicale, 27e série (1966)
1-30.
131. OEDING P., SOMPOLINSKY D.
On typing of Staphylococcus aureus : the relationship
between typing according to phage patterns, serology
and antibiogram.
J. Infect. Dis., (1958), 102, 23-34.
132. OEDING P., WILLIAMS R.E.O.
The type classification of Staphylococcus aureus : a
comparison of phage typing with serological typing.
J. Hyg., (1958), 56, 445-454.

133. OEDING P.
Antigenic properties of *Staphylococcus aureus*.
Bacteriol. Revs., (1960), 24, 376-96.
134. OEDING P.
Propriétés antigéniques du *Staphylococcus aureus*.
Médecine et Hygiène, (1965), 683, 373-374.
135. OEDING P.
Antigen consideration in the classification of *Staphylococci* and *Micrococci*.
SPIZY-Reports from the conference on the Taxonomy of Bacteria held in the Czechoslovak Collection of Microorganisms.
J.E. Purkyne-University Brno., (1967) on September 28 th.
223-225.
136. ORFILA G., RAMPINIC.
Quelques aspects de variations physiopathologiques du lysozyme.
Exposés annuels de Biochimie Médicale, 27e série (1966)
Colloques sur les lysozymes, 155-159.
137. PAL S.C., GOSH-RAY B.
Phosphatase activity of pathogenic *Staphylococci*.
Indian J. Med. Sci., (1962), 16, 516-519.
138. PAN Y.L., BLUMENTHAL H.J.
Correlation between acid phosphatases and coagulase production of phage type of *Staphylococcus aureus*.
J. Bacteriol., (1961), 82, 124-129.
139. PASTEUR L.
Cité par WORMS R.
L'infection staphylococcique.
Ed. Flammarion, (1960).
140. PENY J., BUISSIÈRE J.
VIIe Conférence Internationale de Taxonomie,
Brno. 28 septembre 1967.
141. PEREIRA A.T.
Antigenic loss variation in *Staphylococcus aureus*.
J. Path. Bact., (1966), 81, 151-156.

142. PEREZ-MIRAVETE A., GALLARDO R.
La prueba de la fosfatasa comparata con otras pruebas
patogenicidad di Staphylococcus aureus.
Ciencia, (1959), 19, 29-31.
143. PIKE E.B.
A trial of statistical methods for selection of determi-
nation characters from Micrococcaceae isolates.
Reports from the conference on the taxonomy of Bacteria
held in the czechoslovak collection of microorganisms.
(Sept. Oct. 1965), 316-317.
144. PILLET J., MERCIER P., PERY R.
Recherche sur la fibrinolyse staphylococcique.
Ann. Inst. Pasteur, (1948), 75, 458-471.
145. PILLET J., CALMELS J., ORTA B., CHABANIER G.
Etude comparée du type sérologique, de la sensibilité aux
bactériophages et de l'antibiogramme de 201 souches de
staphylocoques isolés par prélèvement systématique chez
le nourrisson.
Ann. Inst. Pasteur, (1954), 86, 309-319.
146. PILLET J., ORTA B., FOUCAUD M., PERRIER M.
Etude sérologique de 559 souches de Staphylocoques patho-
gènes isolés en France.
Ann. Inst. Pasteur, (1961), 100, 713-24.
147. PILLET J.
Le Staphylocoque hospitalier (II).
Lyon Médical, (1967), 217, 257-266.
148. PLANTEVIN G., NARDON P., LAVIOLETTE P.
2e Congrès Int. de Culture de tissus d'Invertébrés,
Tremezzo, 7-8-9 Sept. 1967.
149. POHJA M.S., GYLLENBERG H.G.
Numerical taxonomy of Micrococacceae of fermented meat
origin.
J. Appl. Bact., (1962), 25, 341-51.
150. POHN H.P.
Zur Differenzierung von Staphylokokken.
Z. Immun. Forsch., (1958), 116, 92-108.

151. PREVOT A.R.
Classification des bactéries.
Bactériologie Médicale, (J. Dumas), (1951).
152. PULVERER G.
Untersuchungen zur Virulenz bestimmung pathogener Staphylokokken.
Z. Hyg. Infekt. Kr., (1964), 150, 211-21.
153. RAMMEL KAMP C.H., LEBOWITZ J.L.
The role of coagulase in staphylococcal infections.
Ann. N.Y. Acad. Sci., (1956), 65, 144-51.
154. RAVIN H.A., BERNSTEIN P., SELIGMAN A.M.
A colorimetric micromethod for the estimation of chymotrypsin activity.
J. Biol. Chem., (1954), 208, 1-15.
155. RIEDEL A., WÜNSCH E., HARTL A.
N-alpha-benzoyl-arginin-beta-naphtyl-amide als Substrats zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung von Trypsin.
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., (1959), 316, 61-70.
156. RICHMOND M.H.
Lytic enzymes of Staphylococcus aureus.
Biochem. Biophys. Acta, (1959), 31, 564-565.
157. RICHOU R., PANTALEON J., QUINCHON G.
Sur la présence dans les filtrats de culture de staphylocoques, d'enzymes attaquant les lipides (graisses neutres-ovolipides et lécithines) et la caséine.
C.R. Acad. Sci. Paris, (1960), 250, 1131-1133.
158. ROGERS D.E., TOMPSETT R.
The survival of Staphylococci within human leukocytes.
J. Exptl. Med., (1952), 95, 209-230.
159. ROGERS H.J., SPENSLEY P.C.
Selective inhibition of the liberation of extracellular enzymes and protein in cultures of Staphylococcus aureus.
Biochem. J., (1955), 60, 635-643.

160. ROSENBACH, OGSTON, FLUGGE, MIGULA, HUCKLER
cités par BAIRD-PARKER A.C.
Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxonom., (1965), 15,
107-108.
161. ROSENDAL K., STENDERUP A., HELMS P.
Staphylococcus aureus strains isolated in Danish hospitals
from 15th April to December 31st 1960.
Acta Pathol. Microbiol. Scand., (1963), 58, 72-84.
162. ROSYPAL S., ROSYPALOVA A., HOREJS J.
The classification of Micrococci and Staphylococci
based on their DNA base composition and Adansonian analyse.
J. Gen. Microbiol., (1966), 44, 281-292.
163. ROUNTREE P.M.
The origin and spread of virulent Staphylococci.
VIIIth International Congress for Microbiology. Montreal.
(1962), 561-569.
164. RUFFO G.
Terreno per l'isolamento e la contemporanea identificazione
degli stafilococchi coagulasi positivi dal latte mastitico.
Boll. Ist. Sieroter. Milanese, (1967), 46, 117-124.
165. SACK G.E., JUDIS J.
Factors affecting the production of staphylocoagulase in a
chemically defined medium.
Ohio J. Sci., (1963), 63, 232-240.
166. SAKURAI N., UPDYKE E.L., NAHMIAS A.J., GERHARDT M.R.
Laboratory observations on the lysogenic properties of
hospital Staphylococci and their possible epidemiological
implications.
Am. J. Public Health, (1961), 51, 566-575.
167. SALTON M.R.J., PAVLIK J.G.
Studies on the bacterial cell-wall. VI - Wall composition
and sensitivity to lysozyme.
Biochem. Biophys. Acta, (1960), 39, 398-407.

168. SALTON M.R.J.
Action of lysozyme on Gram positive bacteria and the structure of cell-walls.
Exposés annuels de Biochimie Médicale. Colloque sur les lysozymes.
27e Série (1966), 35-43.
169. SARTORY R., MEYER J., MALGRAS J.
Rapports entre la pathogénicité et le pouvoir lipasique des staphylocoques.
Bull. Ass. Dipl. Microbiol. Nancy, (1964), 95, 3-8.
170. SHAW C., STITT J.M., COWAN S.T.
Staphylococci and their classification.
J. Gen. Microbiol., (1951), 5, 1010-1023.
171. SHINEFIELD H.R., RIBBLE J.C.
Current aspects of infections and diseases related to Staphylococcus aureus.
Ann. Rev. Med., (1965), 16, 263-284.
172. SIERRA G.
A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and the fatty substracts.
Antonie Van Leeuwenhoek, (1957), 23, 13.
173. SILVESTRI L.G., HILL L.R.
Agreement between deoxyribonucleic acid base composition and taxometric classification of Gram positive cocci.
J. Bact., (1965), 90, 136-140.
174. SMITH W., HALE J.H.
Nature and mode of action of Staphylococcus coagulase.
Brit. J. Exptl. Pathol., (1944), 25, 101-110.
175. SMITH W., HALE J.H., SMITH M.M.
The role of coagulase in staphylococcal infection.
Brit. J. Exptl. Pathol., (1947), 28, 57-67.
176. SMITH D.D., JOHNSTONE J.M.
Staphylocoagulase activity in vivo.
Brit. J. Expt. Pathol., (1956), 39, 165-170.

177. SNEATH P.H.A.
The application of computers to taxonomy.
J. Gen. Microbiol., (1957), 17, 201-226.
178. SNEATH P.H.A.
cité par COLOBERT L.
Pathologie-Biologie, (1965), 13 (3-4), 204-215.
179. SOKAL R.R.
cité par COLOBERT L.
Pathologie et Biologie, (1965), 13 (3-4), 204-215.
180. STERN H., ELEK S.D.
Antigenic structure of Staphylococcus pyogenes.
J. Pathol. Bacteriol., (1957), 73, 473-483.
181. STRASTERS R.C., WINKLER R.C.
Carbohydrates metabolism of Staphylococcus aureus.
J. Gen. Microbiol., (1963), 33, 213-229.
182. STRASTERS R.C.
Dissimilation of mannitol by Staphylococcus aureus.
Antonie Leeuwenhoek.
J. Microbiol. Serol. (1965), 31, 113-123.
183. SZERENNI K.
Eine Nährboden zur schnelleren Diagnose der pathogenen
Staphylokokken.
Zbl. Bakt. Parasit. Abt. I Orig., (1961), 182, 560-561.
184. TAGER M., DRUMMOND M.C.
Staphylocoagulase.
Ann. N.Y. Acad. Sci., (1965), 128 (1) 92-111.
185. TAGER M.
La staphylocoagulase
Médecine et Hygiène, (1965), 683, 375-376.
186. THOMPSON R., KHORAZO D.
Susceptibility to lysozyme of Staphylococci.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., (1935), 33, 299-302.

187. TORLONE U., TITOLI F.
Sull'attività esterasica degli stafilococchi.
Boll. Ist. Sieroterap. Milan, (1961), 40, 569-574.
188. TWORT F.W.
An investigation on the nature of ultramicroscope viruses.
Lancet, (1915), 189, 1241-1243.
189. UJVARY G., ANGYAL T., TOTH L.
Serological typing of Staphylococcus aureus.
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., (1961), 8, 141-147.
190. VERGEZ P.
La lysotypie des staphylocoques : son application en épidémiologie.
Thèse de Médecine, Paris, (1964).
191. VOGELSANG T.M., WORMNES A., ØSTERVOLD B.
Demonstration of staphylococcal enzymes by simple methods.
Transact. of the 13th. Scand. Congr. Path. Microbiol.
(1962), 154, 313-314.
192. WACHTER A.
Etudes de caractères de quelques souches de Staphylocoques d'origine bovine et ovine.
Thèse vétérinaire, Fac. Méd. Paris, (1958).
193. WAHL R., LAPEYRE-MANSIGNAC P.
L'identification des Staphylocoques par les bactériophages.
II. Essai de classification des Staphylocoques par la méthode des phages.
Ann. Inst. Pasteur, (1950), 78, 765-777.
194. WAHL R., FOUACE J.
Sur les principes de classification des Staphylocoques pathogènes par la méthode des phages.
Ann. Inst. Pasteur, (1952), 82, 542-555.
195. WAHL R., FOUACE J.
A propos des techniques d'identification des Staphylocoques pathogènes par les phages.
I. Opération préliminaire et modification proprement dite.
Ann. Inst. Pasteur, (1954), 87, 159-168.

196. WAHL R., FOUACE J.
A propos des techniques d'identification des Staphylocoques pathogènes.
II. Choix d'une méthode de dilution des phages. Etude des fausses réactions produites par les lysats.
Ann. Inst. Pasteur, (1954), 87, 279-286.
197. WAHL R., FOUACE J.
Modification des "types" de Staphylocoques par perte de prophages ou par lysogénisation.
Zbl. Bakt. I abt. Orig., (1958), 171, 573-583.
198. WEBB M.
Action of lysozyme on heat killed gram positive micro-organisms.
J. Gen. Microbiol., (1948), 2, 260-274.
199. WELSCH M.
Le lysozyme des Staphylocoques.
C.R. Séances Soc. Biol. Filiales, (1959), 153, 2080.
200. WILLIAMS S., TIMMINS C.
An investigation of the source of staphylococcal infection in acute osteomyelitis.
Med. J. Aust., (1938), 2, 687-689.
201. WILLIAMS R.E.O., RIPPON J.E.
Bacteriophage typing of "Staphylococcus aureus".
J. Hyg., (1952), 50, 320-353.
202. WILLIAMS R.E.O.
The virulence of Staphylococci.
Eighth International Congress for Microbiology, Montreal (1962), 552-60.
203. WILLIS A.T., TURNER G.C.
Staphylococcal lipolysis and pigmentation.
J. Path. Bact., (1962), 84, 337-347.
204. WILSON G.S., ATKINSON J.D.
Typing of Staphylococci by the bacteriophage method.
Lancet, (1945), 1, 647-658.

205. WORMS R.

L'infection staphylococcique.
Ed. Flammarion (1960).

206. WYSOCKI S., WUNDERLICH R.

Harnstoffspaltung bei pathogenen Staphylokokken. Quanti-
tativer Nachweis.

Z. Hyg. Infekt. Kr., (1963), 149 (4), 315-322.

207. WYSOCKI S., WUNDERLICH R.

Harnstoffspaltung bei pathogenen Staphylokokken.
Qualitative Bestimmung.

Z. Hyg. Infekt. Kr., (1963), 149 (4), 323-326.

208. YONEMURA N.

Über die immunisatorische Einteilung von "Staphylococcus
pyogenes".

Z. Immun. Forsch., (1936), 89, 392-397.

TABLE DES MATIERES

1ère Partie - ETAT ACTUEL DE LA QUESTION

	page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - Historique de la classification des <u>Micrococcaceae</u>	5
CHAPITRE II - Définition de <u>Staphylococcus aureus</u> et de son pouvoir pathogène	19
A. Les épreuves les plus significatives	21
1. Fermentation des glucides	21
2. Recherche de la coagulase	23
3. Recherche des phosphatases	26
4. Recherche des lipases	30
B. Epreuves secondaires	33
1. Recherche des hémolysines	33
2. Recherche de la fibrinolysine	34
3. Recherche de la désoxyribonucléase	34
4. Recherche des protéinases et des peptidases	35
5. Recherche de l'uréase	35
C. Lysotypie	38
D. Sérotypie	40
E. Production de lysozyme	43
CHAPITRE III - Pouvoir pathogène et virulence	45
CHAPITRE IV - Une nouvelle méthode d'étude : Autoxab	57
Chapitre V - Intérêt de l'analyse mathématique dans une classification	69

2ème Partie - TRAVAUX PERSONNELS

	page
CHAPITRE I - Méthodes d'étude	79
A. Utilisation des glucides	79
B. Utilisation de substrats divers autres que les glucides	92
C. Mise en évidence, par le moyen de <u>Bacillus</u> <u>alvei</u> , de la production de lysozyme	103
CHAPITRE II - Résultats obtenus par la méthode Auxotab sur un souchier de référence	107
A. Résultats	108
B. Discussion	108
CHAPITRE III - Résultats obtenus par la méthode Auxotab sur des souches d'origines diverses	115
A. Résultats	115
B. Analyse des résultats par la méthode classique	124
C. Discussion	130
CHAPITRE IV - Analyse par le calcul factoriel des résultats obtenus par le moyen de la méthode Auxotab sur des souches d'origines diverses	135
A. Résultats	135
B. Discussion	138
CHAPITRE V - Corrélations entre le pouvoir pathogène et les caractères biochimiques	141
CHAPITRE VI - Conclusion	143
BIBLIOGRAPHIE	147

